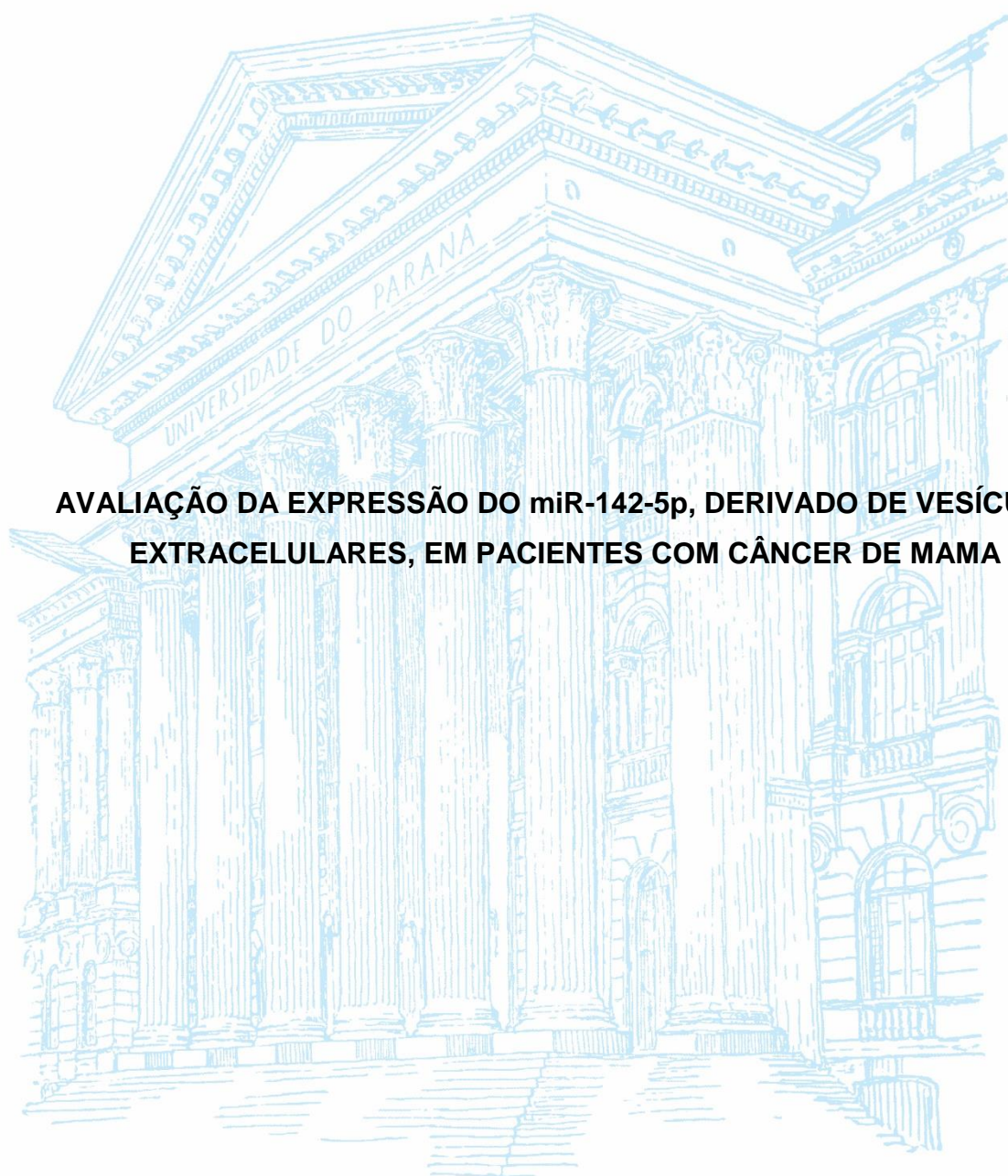


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EVELYN VIEIRA



**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO miR-142-5p, DERIVADO DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES, EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

CURITIBA

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EVELYN VIEIRA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO miR-142-5p, DERIVADO DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES, EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

Monografia apresentada à Coordenação de Ciências
Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná, como requisito parcial para a
obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Daniela Fiori Gradia

Co-orientadores:

Prof^a. Dr^a. Enilze M. S. F. Ribeiro

Dr^a. Patricia M. M. Ozawa

CURITIBA

2018

TERMO DE APROVAÇÃO

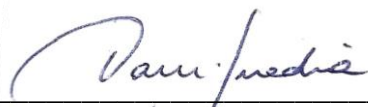
EVELYN VIEIRA

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO miR-142-5p, DERIVADO DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES, EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Biologia.



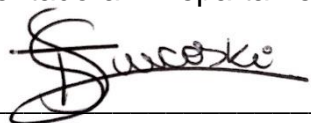
Evelyn Vieira
Graduanda – UFPR



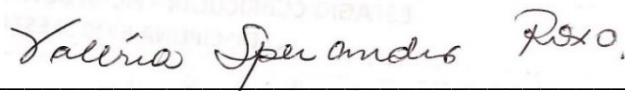
Prof.ª Dr.ª Daniela Fiori Gradia
Orientadora – Departamento de Genética – UFPR



Me. Patricia Midori M. Ozawa
Co-Orientadora – Departamento de Genética – UFPR



Me. Tayana Schultz Jucoski
Departamento de Genética – UFPR



Departamento de Genética – UFPR
Prof.ª Dr.ª Valeria M. M. Sperandio Roxo

Curitiba, 28 de novembro de 2018.

Dedico este trabalho à minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim.

Também dedico este trabalho à Ciência, um dos pilares do desenvolvimento humano que nos permite conhecer o mundo em todos os seus aspectos.

AGRADECIMENTOS

À minha família por acreditar em mim, em especial aos meus pais Regina e Francisco, que batalharam muito para me oferecer uma educação de qualidade e que não mediram esforços para que eu concluísse essa etapa da minha vida. Agradeço também à minha irmã Yasmin por compartilhar comigo tanto os momentos de diversão quanto os de estresse.

Às minhas professoras orientadoras, que se dedicaram diariamente a ensinar e compartilhar todo o seu conhecimento, e também pelo apoio e confiança para a realização deste trabalho.

À minha querida amiga e orientadora Patricia, pela paciência para me ensinar tantas coisas, pela parceria nos dias de pesquisas e pelas muitas conversas e risadas nos momentos de descontração, assim como pela orientação nesse trabalho, que não teria sido possível sem você. Desejo a você toda sorte do mundo nessa próxima etapa da sua vida nos Estados Unidos, porque você merece.

À todos os meus amigos e colegas da Biologia e do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, pelos bons momentos que passamos juntos.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação.

RESUMO

MicroRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA não codificantes que regulam a expressão gênica e estão envolvidos em diversos processos fisiológicos e patológicos. Os miRNAs também são conhecidos por estarem desregulados em diferentes tipos de câncer, incluindo no câncer de mama, e tem sido demonstrado em diversas pesquisas que esses miRNAs podem ser usados como biomarcadores para essa doença. Estudos recentes demonstraram evidências de que os miRNAs são transportados em fluidos corporais dentro de exossomos, definidas como pequenas vesículas extracelulares (VEs) derivadas a partir de diversos tipos celulares, que atuam em processos de comunicação intercelular, tornando sua obtenção bastante fácil através de métodos pouco invasivos. Um dos grandes benefícios de se estudar as VEs e o seu conteúdo de miRNAs, é a possibilidade de utilizá-los como biomarcadores para o desenvolvimento da chamada “biópsia líquida”, que possui como finalidade o diagnóstico e/ou identificação de marcadores prognósticos para o câncer. Sendo assim, neste projeto foi realizada a análise de miRNAs derivados de VEs em soro de pacientes diagnosticados com câncer de mama e indivíduos controles livres da doença em busca de um biomarcador para esta doença. Para isso, as VEs foram extraídas utilizando um kit de precipitação e caracterizadas através das técnicas de análise de rastreamento de nanopartículas, microscopia eletrônica de transmissão e *western blotting*. A análise do miR-142-5p foi realizada por RT-qPCR, e através dela foi possível observar que a expressão desse miRNA pode discriminar pacientes com câncer e controles, além de também ser um bom biomarcador para identificação de pacientes do subtipo luminal A. Este estudo demonstrou que o miR-142-5p, derivado de VEs, possui potencial como biomarcador para o câncer de mama, em especial para o subtipo luminal A e o uso deste como um método pouco invasivo para a identificação desses carcinomas mamários é de grande interesse, uma vez que a facilidade de obtenção dos miRNAs e de análise da biópsia líquida pode impactar positivamente no diagnóstico e escolha da terapia adequada para cada paciente.

Palavras-chave: câncer de mama; microRNA; exossomos; biomarcador

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are small molecules of non-coding RNA that regulate gene expression and are involved in various physiological and pathological processes. MiRNAs are also known for being deregulated in different types of cancer, including in breast cancer, and it has been shown in numerous researches that these miRNAs can be used as biomarkers for this disease. Recent research has found evidence that miRNAs are transported in body fluids within exosomes, defined as small extracellular vesicles (EVs) derived from various cell types, which act in intercellular communication processes, making their retrieval quite easy through minimally invasive methods. One of the greatest benefits of studying EVs and their miRNAs' content is the possibility of using them as biomarkers for the development of the so-called "liquid biopsy", whose purpose is the diagnosis and/or identification of prognostic markers for cancer. Thus, in this project we performed the analysis of miRNAs derived from EVs in serum from patients diagnosed with breast cancer and control individuals free from the disease in search for a biomarker for this disease. For this, the EVs were extracted using a precipitation kit and characterized using the nanoparticle tracking analysis, transmission electron microscopy and western blotting techniques. The analysis of the miR-142-5p was performed by RT-qPCR, and through it, it was possible to observe that the expression of this miRNA can discriminate cancer patients and controls, and in addition, it is also a good biomarker for the identification of luminal A subtype patients. This study demonstrated that the miR-142-5p, derived from EVs, has potential as a biomarker for breast cancer, especially for luminal A subtype and the use of this minimally invasive method for the identification of mammary carcinomas is of great interest, since the ease of obtaining and analyzing the liquid biopsy may positively impact in the diagnosis and in the choice of the appropriate therapy for each patient.

Keywords: breast cancer; microRNA; exosomes; biomarker

LISTA DE ABREVIATURAS

AGO2	– Argonauta 2
AUC	– <i>Area under the curve</i> (área sob a curva)
CD	– Carcinoma ductal
CDI	– Carcinoma ductal invasivo
CDIS	– Carcinoma ductal <i>in situ</i>
cDNA	– DNA complementar
CL	– Carcinoma lobular
CLI	– Carcinoma lobular invasivo
CLIS	– Carcinoma lobular <i>in situ</i>
CMV	– Corpos multivesiculares
CT	– Controle
DE	– Diferencialmente expressos
DEPC	– Dietil-piromcarbonato
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	– Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
dsRNA	– RNA dupla-fita
dTTPs	– Trifosfato de desoxitimidina
ER	– Receptor de estrogênio
EV	– Extracellular vesicles (vesículas extracelulares)
GRB7	– <i>Growth factor receptor-bound protein 7</i> (proteína ligada ao receptor do fator de crescimento 7)
HER2	– <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i> (Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano)
HSP70	– <i>70 kilodalton heat shock proteins</i> (proteínas de choque térmico de 70 kilodalton)
ISEV	– <i>International Society for Extracellular Vesicles</i> (Sociedade Internacional para Vesículas Extracelulares)
KEGG	– Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Enciclopédia de Genes e Genoma de Kyoto)
LA	– Luminal A
M	– Metástase

miRNA	– microRNA
mRNA	– RNA mensageiro
MV	– Microvesículas
N	– Comprometimento do linfonodo regional, com presença ou ausência de metástase
NTA	– <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i> (análise de rastreamento de nanopartículas)
PBS	– <i>Phosphate Buffered Saline</i> (tampão fosfato-salino)
PCR	– Reação em cadeia da polimerase
PR	– Receptor de progesterona
qPCR	– PCR quantitativa em tempo real
RA	– Receptor de Andrógeno
RNA	– Ácido ribonucleico
RNAse	– Ribonuclease
RNAseq	– <i>RNA sequencing</i> (sequenciamento de RNA)
ROC	– <i>Receiver Operating Characteristic</i>
RQ	– Quantificação relativa
RT-qPCR	– Reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa
SDS-page	– <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio)
T	– Tamanho do tumor primário
TEM	– <i>Transmission electron microscopy</i> (microscopia eletrônica de transmissão)
TN	– Triplo negativo
TSG101	– <i>Tumor susceptibility gene 101</i> (gene de susceptibilidade a tumor 101)
VEs	– Vesículas extracelulares
VIL	– Vesículas intraluminais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 CONTEXTO	11
1.2 OBJETIVOS	13
1.3 JUSTIFICATIVA	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 CÂNCER DE MAMA	15
2.1.1 EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA	15
2.1.2 CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA	16
2.2 As VEs	20
2.2.1 DESCOBERTA E FUNÇÃO DAS VEs	20
2.2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS VEs	21
2.2.3 VEs E SEU POTENCIAL CLÍNICO	23
2.3 MicroRNAs	24
2.3.1 VE-miRNAs COMO BIOMARCADORES MOLECULARES	26
2.3.2 miR-142-5p	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	31
3.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS VEs	31
3.2.1 ISOLAMENTO DE VEs	31
3.2.2 CARACTERIZAÇÃO POR ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS (NTA)	32
3.2.3 CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM)	32
3.2.4 CARACTERIZAÇÃO POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	33
3.3 EXTRAÇÃO DOS miRNAs DE EVs	34
3.3.1 SEQUENCIAMENTO DE miRNAs	35
3.3.2 ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DE VIAS	35
3.3.3 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (RT-qPCR)	35
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37

3.4.1	RT-qPCR E DADOS CLINICOPATOLÓGICOS.....	37
3.4.2	ANÁLISE DE CURVAS ROC (<i>RECIEVER OPERATING</i> <i>CARACTERISTIC</i>).....	37
3.4.3	CURVAS ROC.....	37
4.	RESULTADOS.....	38
4.1	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS VEs.....	38
4.1.1	CARACTERIZAÇÃO POR NTA.....	38
4.1.2	CARACTERIZAÇÃO POR TEM.....	40
4.1.3	CARACTERIZAÇÃO POR WB.....	41
4.2	miRNAs IDENTIFICADOS NO RNAseq.....	42
4.3	EXPRESSÃO DO miR-142-5P NA RT-qPCR.....	43
4.4	EXPRESSÃO DO miRNA-142-5p E PARÂMETROS CLINICOPATOLÓGICOS.....	44
4.5	POTENCIAL DIAGNÓSTICO DO miR-142-5p.....	48
4.6	ANÁLISE DAS VIAS KEGG PARA O miR-142-5P.....	51
5.	DISCUSSÃO.....	52
6.	CONCLUSÃO.....	55
7.	REFERÊNCIAS.....	56
8.	APÊNDICE.....	65
9.	ANEXO.....	69

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTO

A cada ano, o câncer de mama é diagnosticado em um número crescente de indivíduos, e por ser considerado uma doença grave, muitas vezes acaba levando o paciente à óbito. Contudo, apesar da gravidade dessa doença e do enfoque que ela vem recebendo tanto da mídia quanto da comunidade científica, ela ainda não é totalmente compreendida, sendo necessários novos estudos para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico, bem como para investigação de estratégias para melhorar o prognóstico e tratamento dos pacientes.

O câncer de mama é atualmente classificado de acordo com a expressão proteica de marcadores imunoistoquímicos, sendo estratificado em quatro subtipos: Luminal A, Luminal B, HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) e Triplo Negativo. Essa classificação leva em consideração a expressão proteica dos receptores hormonais (de estrógeno e progesterona) e receptores HER2, sendo que cada subtipo possui prognósticos e respostas a tratamentos distintos (BOISSEIRE-LACROIX *et al.* 2013).

Exosomos são vesículas extracelulares (VEs) secretadas por praticamente todos os tipos celulares e liberadas na corrente sanguínea, possuindo participação ativa no processo de comunicação celular. Essas VEs têm chamado atenção por possuir em seu interior miRNAs, que podem variar de acordo com as condições fisiológicas ou patológicas do indivíduo (YUANA *et al.*, 2013) bem como de acordo com os tipos de células das quais são originadas. Sendo assim, elas possuem grande potencial para serem utilizadas como biomarcadores em doenças como o câncer (D'SOUZA-SCHOREY e CLANCY, 2012) possibilitando assim o diagnóstico precoce e melhorando o tratamento e sobrevida do paciente.

Os microRNAs (miRNAs) são uma classe de pequenos RNAs não codificantes, que possuem cerca de 22 nucleotídeos, e que atuam na regulação gênica através da repressão da tradução e/ou degradação de

mRNAs (LIU *et al.*, 2017) Em geral, os miRNAs estão envolvidos na regulação de quase todos os processos celulares e estudos têm mostrado que desregulações na sua expressão podem estar relacionadas ao desenvolvimento de doenças como o câncer (FILIPOWICZ *et al.*, 2008; KRÜTZFELDT e STOFFEL, 2006)

Recentemente, foi descoberto que os miRNAs circulantes também estão presentes no interior de vesículas como os exossomos (SKOG *et al.*, 2008), sendo denominados aqui VE-miRNAs. O estudo dessas moléculas tem se mostrado interessante como biomarcadores para diversas doenças, como o Alzheimer (GEEKIYANAGE *et al.*, 2012), diabetes (POVERO *et al.*, 2014), doenças cardiovasculares (CREEMERS *et al.*, 2012) e também o câncer (MITCHELL *et al.*, 2008; DEJIMA *et al.*, 2017; TAYLOR e GERCEL-TAYLOR, 2008).

No câncer de mama, já foram identificados diversos miRNAs que podem ser usados como biomarcadores (HENEGHAN *et al.*, 2010; SI *et al.*, 2012; FERMÍN *et al.*, 2013). Entretanto, ainda existem poucas pesquisas que investiguem os miRNAs presentes em VEs e seus papéis como biomarcadores para o câncer de mama.

Neste estudo, o miR-142-5p foi selecionado a partir da análise de VE-miRNAs, encontrados diferencialmente expressos em dados de sequenciamento, e o seu potencial diagnóstico para o câncer de mama foi estudado utilizando dados de PCR em tempo real (qPCR) em amostras de soro obtidas de pacientes com câncer de mama e indivíduos controle.

1.2 OBJETIVOS

▪ OBJETIVO GERAL:

- Avaliar o potencial como biomarcador do VE-miRNA miR-142-5p no câncer de mama

▪ OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar o tamanho e quantidade de VEs isoladas a partir de soro de pacientes e indivíduos controle.
- Verificar se há constituição diferencial d VE-miRNA miR-142-5p entre subgrupos de pacientes com câncer de mama de acordo com a classificação imunoistoquímica e parâmetros clinicopatológicos;
- Avaliar o potencial desse VE-miRNA como biomarcador de diagnóstico e prognóstico no câncer de mama.

1.3 JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é uma doença heterogênea que afeta mulheres no mundo inteiro, muitas vezes levando-as à óbito. Parte dos mecanismos moleculares através dos quais essa doença se estabelece e age são desconhecidos. Desse modo, estudos nessa área são extremamente importantes para melhor conhecer essa doença e seus mecanismos, auxiliando no desenvolvimento de novos métodos de detecção precoce e tratamentos mais eficientes.

O estudo do conteúdo das VEs, em especial dos seus miRNAs, se mostra importante para o desenvolvimento da chamada “biópsia líquida”, uma vez que as VEs podem ser obtidas através de soro e plasma sanguíneo por meio de procedimentos minimamente invasivos e o seu conteúdo pode ser usado para a identificação de doenças como o câncer. Desse modo, é necessário que os VE-miRNAs sejam estudados para analisar o seu potencial como biomarcador, uma vez que eles podem ser importantes tanto para diagnóstico diferencial de subtipos moleculares do câncer de mama, bem como podem estar associados a características clinicopatológicas específicas, auxiliando o direcionamento do tratamento dessas pacientes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER DE MAMA

2.1.1. EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete o sexo feminino no mundo (Bray *et al.*, 2018), sendo que no Brasil ele é o segundo mais comum, ficando atrás do câncer de pele do tipo não melanoma. A estimativa para o Brasil é de 59.700 casos novos de câncer de mama, para cada ano do biênio 2018-2019, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2017). Sem considerar os tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer também é o mais frequente nas mulheres das Regiões Sul (73,07/100 mil), Sudeste (69,50/100 mil), Centro-Oeste (51,96/100 mil) e Nordeste (40,36/100 mil). Na Região Norte, é o segundo tumor mais incidente (19,21/100 mil) (INCA, 2018).

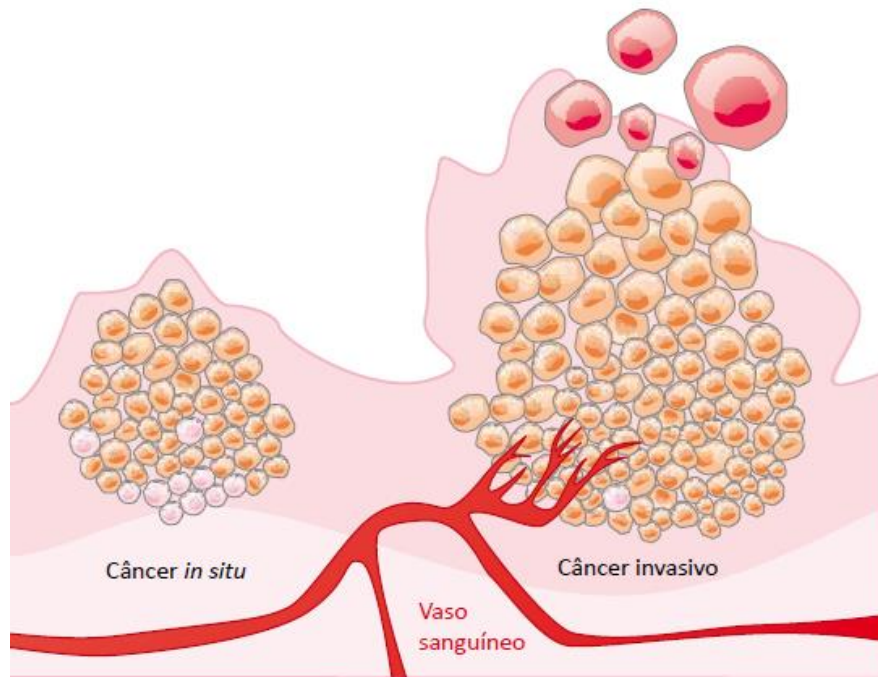
As causas do surgimento de tumores são variadas, pois depende não apenas de causas internas pré-determinadas como também de fatores ambientais e hábitos do indivíduo, como por exemplo, exposição ao sol, tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, falta de atividades físicas, maus hábitos alimentares, obesidade e exposição a substâncias químicas ou radiação. No caso do câncer de mama, fatores que aumentam o risco em mulheres estão relacionados ao tempo de exposição à hormônios estrógenos, tais como menarca precoce e menopausa tardia, baixo número de filhos ou nuliparidade, gravidez tardia, não amamentar ou amamentação por períodos reduzido, uso prolongado de anticoncepcionais e terapias de reposição hormonal. Também existem fatores biológicos que podem contribuir para o desenvolvimento do câncer de mama, sendo eles a etnia do paciente, a idade avançada e também a existência de histórico familiar da doença, muitas vezes relacionados à presença de mutações em determinados genes transmitidos verticalmente, que aumentam a suscetibilidade ao câncer de mama, como o *BRCA1* e *BRCA2* (INCA, 2017).

2.1.2 CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama consiste em um grupo de doenças complexas e heterogêneas, possuindo diversas classificações, que são utilizadas para a determinação do método de tratamento mais adequado (VARGO-GOGOLA e ROSEN, 2007).

A classificação histopatológica subdivide os carcinomas mamários de acordo com o seu local de origem e nível de invasividade. Dentre os tipos de tumores mais comuns na mama, o chamado carcinoma é o mais frequente, se originando a partir de células epiteliais (e sendo classificado de acordo com o seu local de origem). Os tipos menos frequentes de carcinomas de mama são os lobulares (CL), que surgem nos lóbulos da glândula mamária e correspondem de 5 a 15% dos casos. Os carcinomas ductais (CD), que surgem nos ductos mamários, são os mais frequentes e correspondem de 65 a 80% dos casos (HONDERMARCK, 2003; BATEMAN, 2007). Os carcinomas ainda podem ser divididos em *in situ* e invasivos. Os carcinomas *in situ* são caracterizados por possuírem as células tumorais localizadas dentro dos limites da membrana basal. Já no caso dos carcinomas invasivos, a membrana basal é parcial ou totalmente destruída e as células tumorais são livres para invadir progressivamente o estroma circundante, podendo levar à invasão de outros órgãos através das células metastáticas como representado na figura 1 (INCA, 2009). Outras formas menos comuns, incluem os carcinomas mucinosos lobulares, tubulares e apócrinos, correspondendo de 0,1 a 4% dos casos (HONDERMARCK, 2003; BATEMAN, 2007).

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS CARCINOMAS *IN SITU* E INVASIVOS



FONTE: Adaptado de INCA (2009)

LEGENDA: o câncer pode ser classificado em *in situ* e invasivo, que correspondem a uma forma não controlada de crescimento celular quase autônomo, podendo adquirir capacidade metastática, levando à invasão de outros tecidos e órgãos.

Todos os carcinomas invasivos, independentemente do tipo histopatológico, são classificados em um sistema de graus pelo método de classificação de Bloom e Richardson (BLOOM e RICHARDSON, 1957), modificado por Elston e Ellis (ELSTON e ELLIS, 1991), onde o grau I corresponde à tumores mais diferenciados e o grau III à tumores menos diferenciados. Os indivíduos que possuem câncer de mama de alto grau tendem a ter recorrência e metástase com mais frequência e de maneira mais precoce do que aqueles que possuem baixo grau, os quais geralmente têm melhor prognóstico (RAKHA *et al.*, 2010).

Para avaliar a extensão da doença, foi desenvolvido um sistema de estadiamento denominado TNM para a classificação de tumores, que leva em consideração características clínicas e patológicas como tamanho do tumor primário (T), comprometimento do linfonodo regional, com presença ou ausência de metástase (N) e metástase para locais distantes (M), além de categorizar essas informações em graduações (INCA, 2011).

Estudos realizados a partir de 2000, vem dividindo os casos de câncer de mama em subtipos moleculares baseados no seu nível de expressão gênica (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001). Nesses estudos o câncer de mama foi subdividido em cinco categorias chamadas Luminal A, Luminal B, HER2, basal e *normal-like*, sendo adicionados em estudos posteriores, mais dois subtipos: molecular apócrino (FARMER *et al.*, 2005; SANGA *et al.*, 2009) e claudina baixa (PRAT *et al.*, 2010).

Os tumores do tipo Luminal (A e B) apresentam expressão de receptor de progesterona (RP) e estrogênio positivos (EP) e de outros marcadores como queratina 8/18. O subgrupo HER2 (Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano) positivo possui uma superexpressão dessa proteína e de outros genes como o *GRB7*. O subtipo basal possui RP, PR e HER2 negativos, porém são reativos para citoqueratina 5 e 17, integrina $\beta 4$ e laminina. O *normal-like* é positivo para marcadores como o da proteína 4 de ligação ao ácido graxo e PPAR γ (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001). Já o subtipo molecular apócrino apresenta receptores RE negativos, mas mostra altos níveis de receptores de andrógeno (RA) (FARMER *et al.*, 2005; SANGA *et al.*, 2009) e por fim o subtipo claudina baixa, como o nome já diz, expressa baixos níveis de claudina 3, 4 e 7, além de baixos níveis de E-caderina e CD24 (PRAT *et al.*, 2010).

Contudo, apesar da importância da classificação molecular para o prognóstico das pacientes, a implementação dela nos sistemas de saúde, principalmente de países em desenvolvimento, não é algo viável devido à sua dificuldade técnica e altos custos. Desse modo, na Conferência de St Gallen em 2011 (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011) foi sugerida uma classificação simplificada, revista posteriormente em 2013 (GOLDHIRSCH *et al.*, 2013) que leva em consideração características clinico-patológicas, que são estratificadas conforme uma análise imunohistoquímica dos tumores, surgindo então um método de classificação mais viável para ser usado nos sistemas de saúde. Através desta técnica é possível realizar uma aproximação dos subtipos moleculares (Quadro 1) de acordo com a expressão proteica dos marcadores: receptor de estrogênio (RE) e progesterona (RP), HER2 e Ki-67 (*Proliferation-related ki-67 antigen*). Essa

classificação simplificada inclui o subtipo Luminal A, Luminal B, HER2 e Triplo Negativo (TN), sendo que o último apresenta algumas sobreposições de características com o subtipo basal, como por exemplo, maior agressividade do tumor e prognósticos piores, no entanto, os dois não são sinônimos. Além do fato do subtipo basal ser baseado no perfil de expressão gênica e o triplo negativo na expressão proteica, o subtipo triplo negativo é um diagnóstico por exclusão, dado que não apresenta nenhuma das proteínas utilizadas na classificação por imunoistoquímica (RP, RE e HER2), se mostrando um grupo heterogêneo e de difícil tratamento (ALLURI e NEWMAN, 2014).

QUADRO 1: CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CÂNCER DE MAMA

Subtipo intrínseco	Definição clínico-patológica	Marcadores Imunohistoquímicos			
		RE	RP	HER2	Ki-67
Luminal A	Luminal A-like	POS	POS	NEG	Baixo
Luminal B	Luminal B-like (HER2 positivo)	POS	NEG ou baixo*	NEG	Alto*
	Luminal B-like (HER2 negativo)	POS	q.v.	POS	q.v.
HER2 superexpresso	HER2 positivo	NEG	NEG	POS	-
“Basal-like”	Triplo negativo	NEG	NEG	NEG	-

FONTE: Adaptado de Goldhirsch *et al* (2013).

LEGENDA: RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; HER2: receptor tipo 2 do factor de crescimento epidérmico humano; KI-67: índice de proliferação celular; q.v: qualquer valor; NEG: negativo POS: positivo.

NOTA: os valores com asterisco (*) indicam a necessidade da presença de pelo menos um dos marcadores citados.

Os termos “alto” e “baixo” correspondem à expressão de Ki-67 maior que 20% e menor que 20%, respectivamente. As porcentagens do limiar podem variar de acordo com a metodologia aplicada para sua detecção

2.2 AS VEs

2.2.1 DESCOBERTA E FUNÇÃO DAS VEs

Um dos mecanismos fundamentais para o bom funcionamento de um organismo multicelular é a comunicação intercelular. Através desse processo, milhões de células podem se comunicar e trabalhar juntas para executar importantes processos celulares que são essenciais para a sobrevivência do organismo. Esse processo é conhecidamente mediado por contato direto célula-célula ou por transferência de moléculas secretadas (MITTELBRUNN e SÁNCHEZ-MADRID, 2012; AHMED e XIANG, 2010). Porém, nas últimas décadas outro método de comunicação foi descrito: a transferência de VEs entre as células.

A existência das VEs foi inicialmente relatada no ano de 1981 por TRAMS *et al.* com a descoberta de microvesículas secretadas por linhagens de células neoplásticas (TRAMS *et al.*, 1981). Mais tarde, em 1983, foi identificado a liberação de pequenas vesículas de aproximadamente 50nm contendo receptores de transferrina em reticulócitos maduros para o meio extracelular. Posteriormente, essas vesículas foram chamadas de exossomos (HARDING *et al.*, 1983; PAN e JOHNSTONE, 1983).

As VEs são compostas por uma bicamada lipídica e estão presentes em todos os fluídos corporais. Além disso, elas são secretadas por todos os tipos de células humanas já analisadas até o momento (THÉRY *et al.*, 2009; GYÖRGY *et al.*, 2011; VAN DER POL *et al.*, 2012).

Nessa última década, as VEs têm sido reconhecidas como poderosos veículos para a comunicação entre células, tanto em organismos procarióticos quanto eucarióticos. Isso se deve em grande parte à sua capacidade de transferir proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos e outras moléculas importantes, entre as células. Desse modo, influenciando em diversas funções fisiológicas e patológicas, motivo pelo qual se tornaram bastante interessantes como objeto de estudo para diversos tipos de patologias, entre eles o câncer (YÁNEZ-MÓ *et al.*, 2015).

2.2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS VEs

Desde a época de sua descoberta, as VEs receberam diversos nomes como ectossomos, microvesículas, exossomos, micropartículas, corpos apoptóticos, entre outros (GOULD e RAPOSO, 2013). A princípio, o nome exossomos era usado para caracterizar vesículas cujo tamanho variava entre 40 e 1000nm, liberadas por diversos tipos de células de cultura (TRAMS *et al.*,1981). Atualmente as vesículas extracelulares podem ser amplamente classificadas em exossomos e microvesículas (MVs) de acordo com seu tamanho e origem conforme o quadro 2:

QUADRO 2 – CLASSIFICAÇÃO DAS VEs

	Exossomos	Microvesículas
Origem	Via endocítica	Membrana plasmática
Tamanho	40-120 nm	50-1000 nm
Função	Comunicação intercelular	Comunicação intercelular
Marcadores	Alix, TSG101, Tetraspaninas (CD9, CD63)	Integrinas, selectinas, CD40
Conteúdo interno	Proteínas e ácidos nucleicos (DNA, mRNAs, miRNAs e outros RNAs não codificantes).	Proteínas e ácidos nucleicos (DNA, mRNAs, miRNAs e outros RNAs não codificantes).

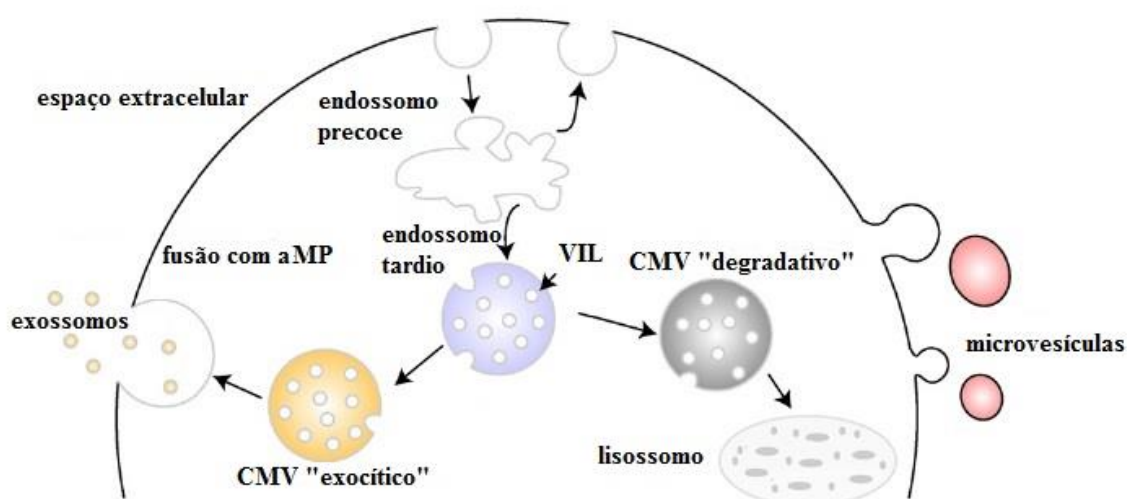
FONTE: Adaptado de ABCAM (2015)

A formação dos exossomos se dá a partir de endossomos, através de pequenas invaginações da membrana endossomal, que darão origem às vesículas intraluminais (VILs). Os endossomos, quando estão repletos de VILs, chamam-se corpos multivesiculares (CMVs), que podem possuir duas funções: direcionar o seu conteúdo para a degradação por lisossomos ou secretar o seu conteúdo, após a fusão com a membrana plasmática, dando

origem aos exossomos. Já a formação das MVs se dá por brotamento direto a partir da membrana plasmática (HARDING *et al.*, 1983; 1984). Essas etapas estão representadas na figura 2.

Os exossomos também se diferenciam das MVs por possuírem um formato uniforme e também por possuírem propriedade de sedimentação no gradiente de sacarose na densidade de 1,10-1,21 g/mL. Em contrapartida, as microvesículas possuem formato heterogêneo e maior propriedade de sedimentação, atingindo níveis acima de 1,23 g/mL.(THERY *et al.*, 2001).

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA BIOGÊNESE DOS EXOSSOMOS E DAS MICROVESÍCULAS EXTRACELULARES



FONTE: Adaptado de MATHIVANAN *et al.* (2010).

LEGENDA: Os exossomos são formados a partir de invaginações da membrana endossômica que formarão as vesículas intraluminais (VILs). Quando os endossomos estão preenchidos por essas pequenas vesículas, eles são chamados de corpos multivesiculares (CMVs). Já as microvesículas são formadas por brotamento a partir da membrana plasmática (MP).

Devido à sua origem endocítica, os exossomos são muitas vezes enriquecidos com moléculas características do endossomo, tais como Alix, TSG101, HSP70, CD63, CD81, CD9, e os lipídios fosfatidilserina expostos, ceramida, esfingomiélin e colesterol. Algumas dessas moléculas, como as proteínas Alix e TSG101, são normalmente usadas como marcadores de

exossomos. As proteínas Tetraspaninas como CD9, CD63 e CD81 são uma família de proteínas de membrana conhecidas por formarem agrupamentos na membrana plasmáticas dos exossomos de forma abundante, podendo também ser considerados como marcadores. (BORGES *et al.*, 2013; MATHIVANAN *et al.*, 2010).

Os exossomos se comunicam com as células-alvo, levando à transferência de seu conteúdo, através de três diferentes métodos: o contato célula-célula, a fusão com a célula-alvo, que levaria a transferência do conteúdo interno do exossomos, e por sinalização através da clivagem do ectodomínio das proteínas existentes na membrana plasmática dos exossomos, que se ligariam a receptores de superfície da célula-alvo (MATHIVANAN *et al.*, 2010).

Embora existam métodos que permitam o isolamento de VEs, nenhum desses métodos atuais é considerado eficiente para isolar frações suficientemente puras de exossomos. Portanto, de acordo com as recomendações da Sociedade Internacional para Vesículas Extracelulares (ISEV), será adotada nesse trabalho a terminologia geral “vesícula extracelular” para tratar de frações vesiculares enriquecidas com exossomos, tendo como referência para esse enriquecimento a alta expressão de marcadores bioquímicos CD9 e CD63.

2.2.3 VEs E SEU POTÊNCIAL CLÍNICO

Um dos fatores que torna os exossomos extremamente interessantes para o uso em métodos clínicos é o fato de estarem presentes em diversos fluídos corporais, incluindo sangue (CABY *et al.*, 2005), sêmen (RONQUIST e BRODY, 1985; PARK *et al.*, 2011; AALBERTS *et al.*, 2012), urina (PISITKUN *et al.*, 2004), saliva (OGAWA *et al.*, 2011), leite materno (ADMYRE *et al.*, 2007), fluído amniótico (ASEA *et al.*, 2008), fluído cerebrospinal (VELLA *et al.*, 2007), bile (MASYUK *et al.*, 2010), entre outros. Esse fato possibilita que os exossomos sejam obtidos através de métodos pouco invasivos, o que aumenta o interesse de usá-los como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico. Além disso, já foi observado que há uma relação entre concentrações aumentadas de exossomos no soro de pacientes com câncer

quando comparados à indivíduos sem a doença, o que ilustra sua importância em processos patológicos (TAYLOR e GERCEL-TAYLOR, 2008; LOGOZZI *et al.*, 2009; O'BRIEN *et al.*, 2013).

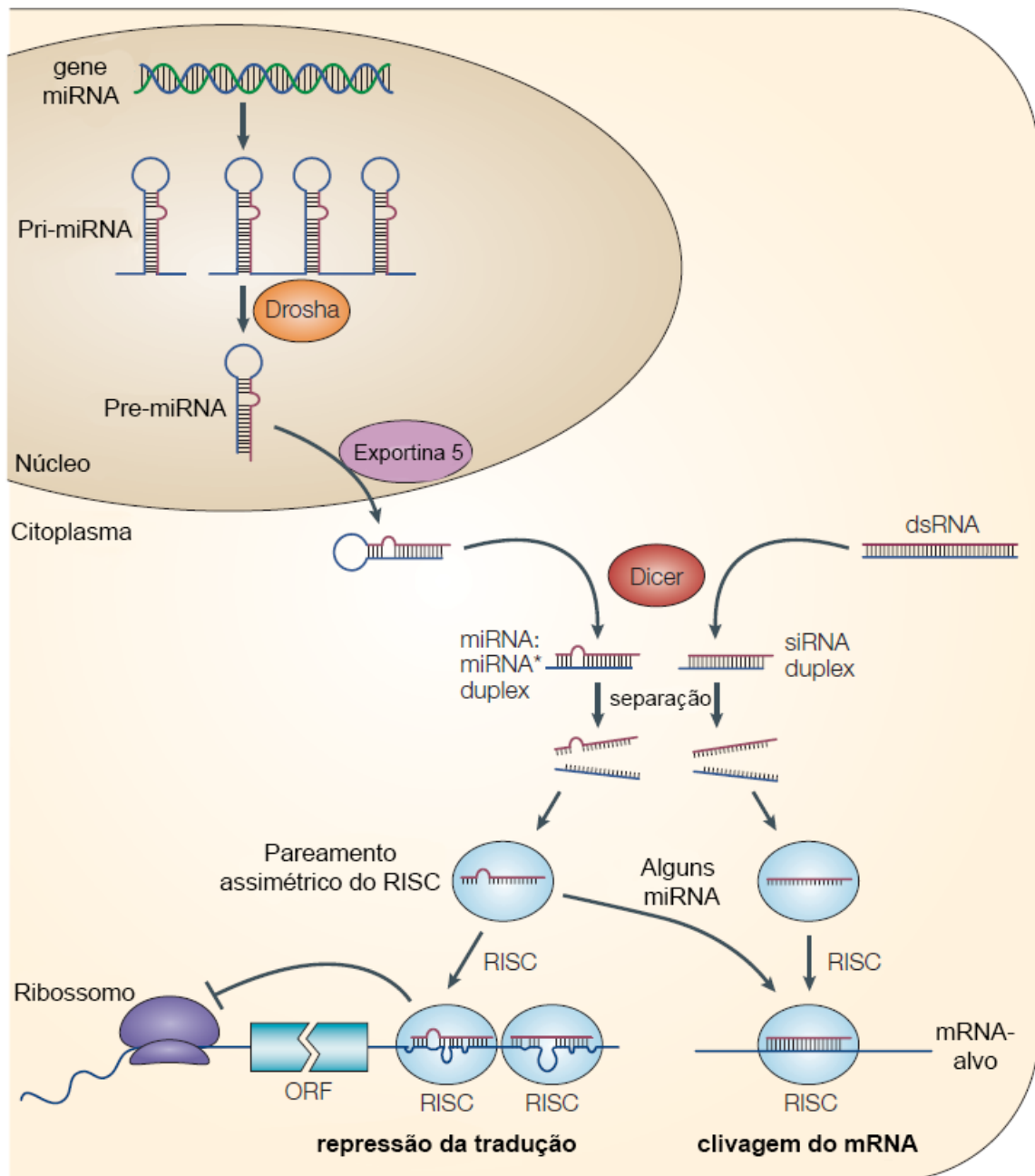
Os exossomos têm sido relatados no estudo e diagnóstico de diversas doenças, principalmente no câncer. Exemplo disso é o estudo feito por NILSSON e colaboradores (2009), no qual marcadores específicos (PCA-3 e TMPRSS2:ERG) do câncer de próstata foram detectados e isolados a partir de exossomos obtidos da urina de pacientes com câncer de próstata. Outro estudo, realizado por TAYLOR e GERCEL-TAYLOR (2008) mostrou que o perfil de miRNAs presentes nos exossomos de pacientes com câncer de ovário pode ser utilizado como biomarcador para avaliação de risco e no diagnóstico precoce, evidenciando assim, o importante papel das VEs e de seu conteúdo, especialmente de miRNAs, para o diagnóstico de doenças.

2.3 MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são uma classe de pequenos RNAs não codificantes, possuindo cerca de 22 nucleotídeos, que apresentam um papel importante na regulação da tradução e degradação de mRNAs através de pareamento complementar (LIU *et al.*, 2017). Em geral, os miRNAs possuem função de regulação pós-transcricional, estando envolvidos na regulação de quase todos os processos celulares testados e desregulações na sua expressão podem levar ao desenvolvimento de doenças como o câncer (FILIPOWICZ *et al.*, 2008; KRÜTZFELDT e STOFFEL, 2006).

A biogênese dos miRNAs envolve a RNA polimerase II, que transcreve os genes que codificam os miRNAs em miRNAs primários (pri-miRNA) que ainda no interior do núcleo, são clivados pela Drosha em um miRNA precursor (pré-miRNA) formando uma estrutura em formato *hairpin*. Posteriormente, através da enzima exportina-5, o pré-miRNA é enviado ao citoplasma, onde é clivado pela Dicer, gerando um miRNA maduro de cerca de 22 nucleotídeos de comprimento (França *et al.* 2010) (figura 3).

FIGURA 3: BIOGÊNESE DOS miRNAs



FONTE: Adaptado de HE e HANNON (2004)

LEGENDA: a biogênese dos miRNAs, começa com o processamento do transcrito de Pri-miRNA pela Drosha em Pré-miRNA dentro do núcleo. Em seguida, os pré-miRNAs são enviados para o citoplasma pela Exportina 5, sendo então transformados em miRNA:miRNA* duplex pela enzima Dicer. Essa enzima também é responsável por processar moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) em pequenos RNA de interferência (siRNA). Uma ou mais fitas de miRNA:miRNA* ou de siRNA é então incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), em seguida agindo na repressão da tradução ou clivagem do mRNA.

Os miRNAs tem a importante função de serem reguladores pós-transcricionais, o que pode levar a um aumento ou diminuição na expressão de um gene ou proteína. Calcula-se que os miRNAs sejam responsáveis pela regulação de cerca de 30% dos genes humanos (LEWIS *et al.*, 2005). Desse modo, os miRNAs são responsáveis pela regulação de diversos processos biológicos, tais como o metabolismo celular, desenvolvimento, expressão gênica, processamento de informações e homeostase tecidual (ULTSCH e LOTSCH, 2014).

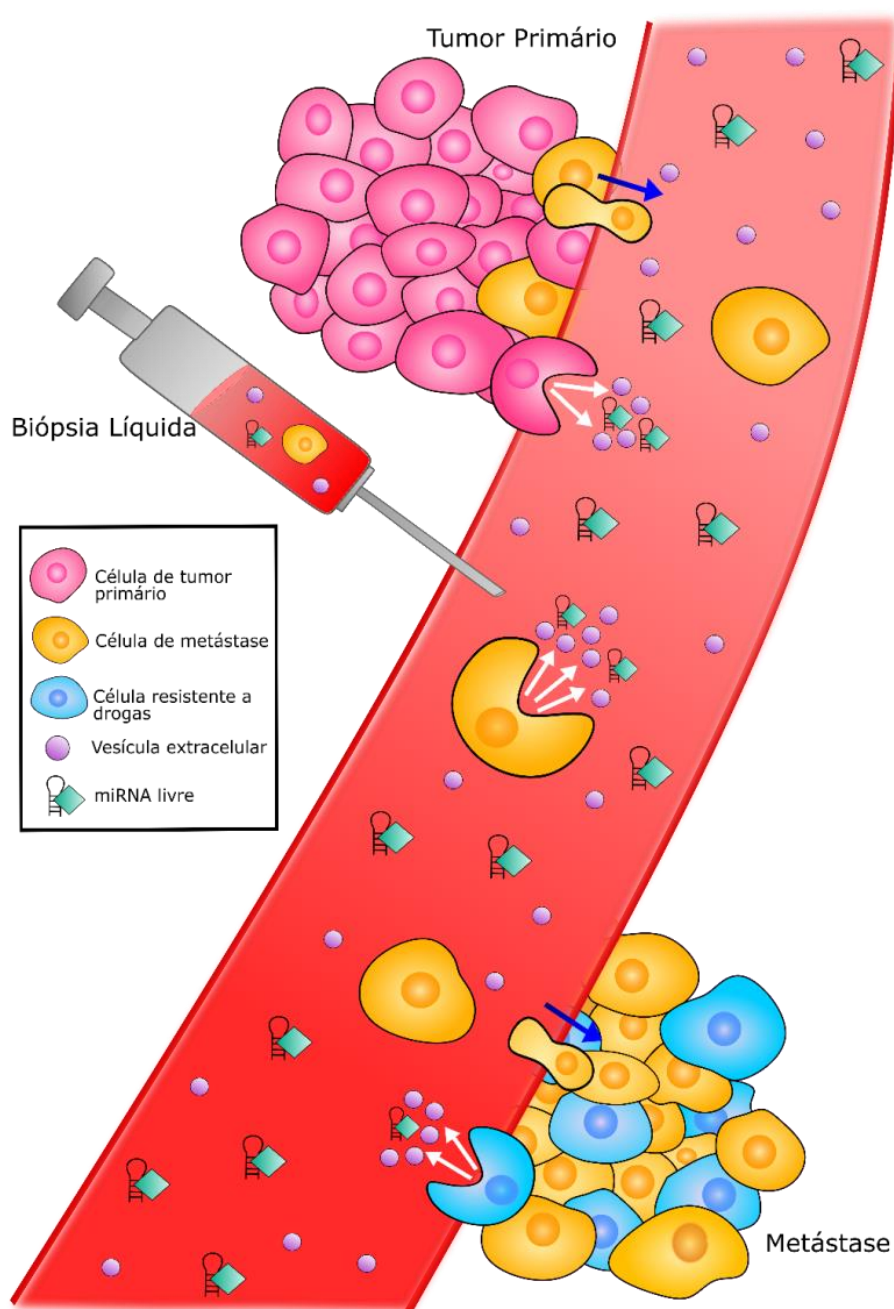
Contudo, um dos maiores interesses acerca dos miRNA está na possibilidade de serem usados como biomarcadores moleculares de diagnóstico e prognóstico. Os miRNAs circulantes têm sido estudados visando o uso para esse fim nos mais diversos tipos de doenças, como o Parkinson (ROSER *et al.*, 2018), Alzheimer (GEEKIYANAGE *et al.*, 2012), osteoporose (MANDOURAH *et al.*, 2018), diabetes (CHIEN *et al.*, 2015) e também o câncer (MITCHELL *et al.*, 2008; DEJIMA *et al.*, 2017; TAYLOR e GERCEL-TAYLOR, 2008), incluindo o câncer de mama (HENECHAN *et al.*, 2010).

2.3.1 VE-miRNAS COMO BIOMARCADORE MOLECULARES

Sabe-se que os miRNAs estão presentes nos fluídos corporais não só na forma circulante, estando associados à proteínas como Argonauta 2 (AGO2) (ARROYO *et al.*, 2011), mas também no interior de vesículas como os exossomos (SKOG *et al.*, 2008), e o uso de VE-miRNAs como biomarcadores é vantajoso, pois pode ser utilizado na biópsia líquida.

A chamada biópsia líquida consiste na amostragem e análise de tecido biológico não sólido, principalmente sangue (CROWLEY *et al.*, 2013). Como a biópsia tradicional, esse tipo de técnica pode ser usado principalmente como uma ferramenta de diagnóstico e monitoramento de doenças como o câncer, com o benefício adicional de ser minimamente invasivo. O potencial de VE-miRNAs como biomarcadores na biópsia líquida para o câncer está representado na figura 4.

FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO USO DOS miRNAs PARA A BIÓPSIA LÍQUIDA



FONTE: O AUTOR (2018)

LEGENDA: a biópsia líquida utiliza fluidos corporais como o sangue, para realizar análises em busca de biomarcadores, como por exemplo, miRNAs circulantes (livres ou no interior de vesículas extracelulares), que são originados de diversas fontes envolvidas na patogênese do câncer, tais como células do tumor primário, células de metástase e células resistentes a drogas.

No câncer de mama, Heneghan e colaboradores (2010) reportou que o miR-195 pode ser encontrado com aumento de expressão em tumores e que os níveis circulantes desse miRNA diminuam nos pacientes após a cirurgia para níveis comparados aos controles. Fermín e colaboradores (2013) detectou três miRNAs circulantes em soro (miR-145, miR-155 e miR-382) que mostraram boa sensibilidade e especificidade para identificar câncer de mama na população mexicana. Si e colaboradores (2012) reportou que em amostras de tecido e soro, os níveis de miR-92a estavam significativamente reduzido enquanto os de miR-21 estavam aumentados. Esses valores estavam associados com o tamanho do tumor e com metástase no linfonodo.

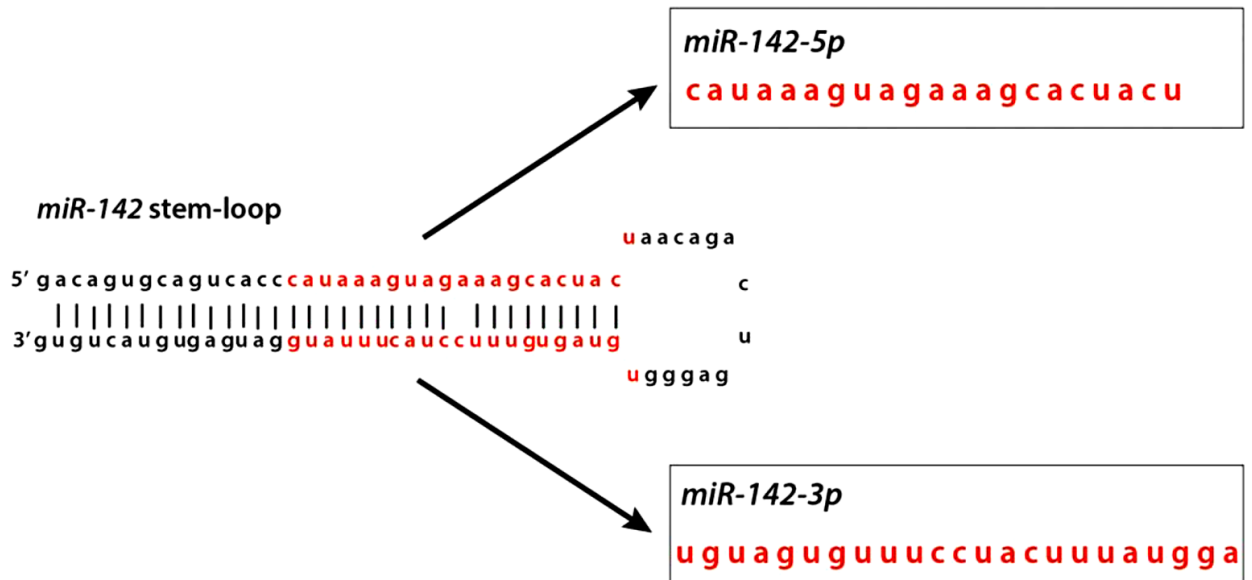
O estudo envolvendo miRNAs contidos no interior das VEs ainda está no início e poucos autores tem estudado os VE-miRNAs como biomarcadores moleculares. O único estudo existente atualmente acerca de VE-miRNAs como biomarcadores em câncer de mama foi feito por Hannafon e colaboradores (2016), no qual foi estudado a influência do ácido docosahexanóico (DHA), um composto com propriedades anticâncer e antiangiogênese, sobre VE-miRNAs de células de câncer de mama (HANNAFON *et al*, 2016).

Desse modo, a facilidade de obtenção das VEs, associado ao potencial clínico dos miRNAs em seu interior, os tornam importantes objetos de pesquisa na busca por métodos de diagnóstico e prognóstico para o câncer.

2.3.2 miR-142-5p

Entre os diversos microRNAs que têm sido estudados desde sua descoberta, um que é pouco estudado, mas parece ser bastante interessante, é o miRNA-142, um pré-microRNA cujo gene que o codifica se encontra no cromossomo humano 17q22. Ele possui uma estrutura de *stem-loop* característica (Figura 5) e atua como precursor de duas espécies de miRNA: o miR-142-5p e miR-142-3p (SHRESTHA *et al*. 2017). Esses miRNAs têm sido relatados em pesquisas recentes como reguladores críticos de muitos processos biológicos, estando associado à vias de sinalização envolvidas em processos de desenvolvimento embrionário, homeostase e também doenças (ZHANG *et al*, 2010; MA *et al*, 2016).

FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO miR-142 e suas duas formas maduras



FONTE: Adaptado de Shrestha *et al.* (2017)

Legenda: o miRNA-142 *stem-loop* da origem a duas formas maduras de miRNA: o miR-142-3p e o miR-142-5p.

O miR-142-5p, uma das isoformas do miR-142, tem sido reportado em diversos tipos de condições patológicas, tais como distúrbios imunológicos, inflamações, fibrose e também no câncer (TALEBI *et al.* 2017; VOELLENKLE *et al.*, 2010; TSANG *et al.* 2015).

Alguns autores têm relatado estudos envolvendo o miR-142-5p, entre eles estão Su e colaboradores (2013), que reportaram a interação do miR-142-5p com genes hiper e hipo regulados e pode estar envolvido no ciclo de desenvolvimento de câncer de pulmão escamoso. Também foi reportado por Tsang e colaboradores (2015) que ambos os miR-142-5p e -3p estão significativamente pouco expressos em carcinomas hepatocelulares, sendo que os níveis de expressão caem ainda mais conforme a doença progride, além de atuar na motilidade das células. Porém, ainda existem poucos estudos acerca do potencial desse miRNA como biomarcador. Apenas o estudo de Hannafon e colaboradores (2016) detectaram a presença do miR-142 em exossomos presentes em amostras de plasma de câncer de mama, podendo atuar como um indicativo de sua presença.

Portanto, o estudo do miR-142-5p em câncer de mama é extremamente

importante e interessante para o desenvolvimento de um possível biomarcador para essa doença e assim contribuir uma melhora no diagnóstico precoce e no prognóstico das pacientes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

O presente estudo foi realizado com amostras de soro de pacientes do sexo feminino obtidas no Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG) Curitiba, Paraná, no momento da cirurgia, com a assinatura do termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pacientes. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde, UFPR, sob o número de CAAE: 67029617.4.0000.0102, parecer: 2033689.

Foram coletadas amostras de soro de 31 pacientes com câncer de mama ductal invasivo (16 luminal A (LA) e 15 triplo negativo (TN)). A classificação de acordo com os subtipos luminal e triplo negativo, definida por imunoistoquímica, foi realizada a partir de dados obtidos dos prontuários e laudos histopatológicos (RE, RP, HER2, Ki-67). Os dados clínicos e histopatológicos analisados foram idade, grau do tumor, tamanho do tumor, linfonodo sentinela afetado ou não e presença ou não de metástases distantes. O soro de indivíduos saudáveis (CT, n=16) foi coletado na Universidade Federal do Paraná, mediante voluntariado, com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE) por parte das participantes. Todas as amostras foram coletadas utilizando tubos de soro *vacutainer* com gel de 8,5mL (BD, EUA) e centrifugadas (CT-0307 Parasec, BR) a 770g por 10 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C até uso.

3.2. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS VEs

3.2.1 ISOLAMENTO DE VEs

As amostras de soro foram descongeladas e centrifugadas a 2000 g por 30 minutos a temperatura ambiente para a remoção de células e outros detritos. Foram transferidos 300µL (para a caracterização) de soro clarificado para um novo tubo, seguido pela adição do reagente *Total exosome isolation*

from serum, homogeneizado por vórtex e depois incubado a 2°C por 30 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 10 minutos em temperatura ambiente. Por fim, as amostras utilizadas para extração de RNA e caracterização foram eluídas em 200µL de PBS 1x filtrado (0.22µm), e procederam imediatamente para a etapa de extração de RNA, ou congeladas a -80°C. Já as amostras utilizadas para caracterização das proteínas foram ressuspendidas em 150µL de tampão de lise e armazenadas a -20°C. O sobrenadante dessas amostras foram guardados e utilizados para caracterização por *Western blotting*.

3.2.2 CARACTERIZAÇÃO POR ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE PARTÍCULAS (NTA)

Para caracterizar as VEs por tamanho e concentração foi utilizada a metodologia de Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA, *Nanoparticle Tracking Analysis*) com o equipamento Nano-Sight LM10 (*NanoSight*, UK), pertencente ao Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ-PR, Curitiba, Brasil. Essa metodologia permite a visualização do tamanho das vesículas da amostra em um microscópio óptico, utilizando-se dos movimentos brownianos e princípios de dispersão da luz. Esse equipamento permite o monitoramento de partículas da amostra com diâmetros entre 10nm a 2000nm e fornece a concentração de partículas por mL, a média, a moda e a mediana do tamanho das vesículas.

Para as amostras de soro, 5 amostras de VEs de cada grupo (CT, LA e TN) foram diluídas aproximadamente 1:1000, colocadas em uma seringa de 1mL, individualmente, e bombeadas pelo equipamento em pressão e temperatura constantes, de forma a entrarem em movimento. Um laser verde incide sobre as partículas em movimento, de forma a torná-las visíveis, sendo possível captá-las em vídeos. Foram gerados 5 vídeos de 30seg por amostra, através dos quais calculou-se o tamanho e a quantidade das partículas, com base na média dessas imagens.

3.2.3 CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM)

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM, *Transmission Electron Microscopy*), foi utilizada como um segundo método de caracterização das VEs por tamanho e formato. Aproximadamente 7 μ L de VEs (extraídas conforme item 4.2.1) foram misturadas com 22.5 μ L de paraformaldeído 4% e incubadas por aproximadamente 5 min. Este procedimento foi realizado na capela de exaustão utilizando-se parafilme como base, a temperatura ambiente. Em seguida, 8 μ L dessa solução foram adicionados a uma grade de cobre previamente tratada com uma camada de Formvar, um filme comumente utilizado em TEM para dar suporte à grade, e incubadas por 2 min. O líquido foi removido utilizando um papel filtro, e 8 μ L de acetato de urânio foram adicionados no topo da grade, agindo por 1 min. Após o tempo de incubação, o acetato de urânio foi removido com papel filtro e a grade foi invertida, por 1 min, em cima de 200 μ L de água que haviam sido colocados em um parafilme. Em seguida a grade foi seca com papel filtro e armazenada até posterior análise.

A análise foi realizada utilizando o microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200EX II (JEOL, JP), 110V, disponível no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil, com o auxílio da Professora Dra. Lucélia Donatti. As imagens foram capturadas utilizando um aumento de 30000x, para obtenção de uma barra de escala de 200nm.

3.2.4 CARACTERIZAÇÃO POR *WESTERN BLOTTING* (WB)

Para verificar que as amostras de VEs estão enriquecidas com exossomos, foi utilizada a técnica de *western blotting* com anticorpos específicos para proteínas características dos exossomos como CD9 e CD63.

As EVs foram quantificadas pelo ensaio de Bradford (Bio-Rad, USA), lidas a uma absorbância de 595nm em um leitor de ELISA (BioTek, USA), localizado no Departamento de Fisiologia da UFPR. As concentrações foram determinadas baseadas em uma curva padrão (0 - 5mg/mL), diluída em tampão de lise.

A seguir, foi realizada uma eletroforese em gel *sodium dodecyl sulfate*

polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-page) utilizando um sistema vertical de eletroforese (Bio-Rad, USA) durante 1h30, a 110V, para a separação das proteínas contidas nas amostras aplicadas no gel de acordo com o peso molecular. Aproximadamente 30µg de cada amostra (VE e sobrenadante depletado da amostra controle, VE e sobrenadante depletado da amostra de câncer) foram preparadas utilizando tampão não redutor (sem beta-mercaptoetanol) e aplicadas no gel para a corrida.

De modo a tornar as proteínas mais acessíveis a detecção pelo anticorpo escolhido, foi realizada a transferência destas do gel para uma membrana Amersham Protran Premium 0.2 de nitrocelulose (GE Healthcare Life Science, UK) por 2h, no gelo, utilizando o sistema trans-blot (Bio-Rad, USA). Em seguida, as membranas foram coradas com Ponceau (Sigma-Aldrich, USA) para confirmar que as proteínas foram devidamente transferidas e para fazer a marcação de massa molecular. Em seguida foram lavadas 3x com *Tris Buffered Saline with Tween® 20* (TBST), para retirar o Ponceau. O próximo passo foi realizar o bloqueio da membrana utilizando leite desnatado em TBST por 1h para impedir interações não específicas do anticorpo e então, incubar a membrana *overnight* utilizando anticorpos monoclonais de camundongo anti-CD63 (Invitrogen) e anti-CD9 (Biolegend, USA) humano, ambos na diluição de 1:1000. Em seguida, o anticorpo secundário anti-mouse IgG com *horseradish* peroxidase (HRP) (Sigma-Aldrich, USA) foi incubado na diluição de 1:2000, por 1h.

Por fim, as proteínas foram detectadas utilizando o kit *SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fisher Scientific, USA), capturadas utilizando o filme ultra sensível *Amersham Hyperfilm ECL* (GE Healthcare Life Science, UK) e reveladas com fixador e revelador *Carestream® Kodak® autoradiography GBX* (Carestream, USA), utilizando um cassete em sala escura.

3.3. EXTRAÇÃO DOS microRNAs DE VEs

A extração dos RNAs das VEs exossomos foi realizada utilizando o kit comercial *mirVana* (Invitrogen, USA), utilizando o controle exógeno *cel-mir-39*

(25pmol) e o uso de trizol em substituição ao fenol. As amostras foram ressuspensas em 20µL de tampão de eluição e tiveram sua quantidade e grau de pureza medidos usando o aparelho Nanodrop 2000 (ThermoFischer Scientific, USA). As amostras foram armazenadas em freezer a -80 °C até posterior uso.

3.3.1 SEQUENCIAMENTO DE miRNAs

Em um estudo anterior realizado no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (LabCHO) da UFPR (OZAWA, 2018), foi realizado o sequenciamento de miRNAs provenientes de VEs de pacientes e controles. Essa análise foi realizada utilizando *pools* de amostras LA, TN e CT, ou seja, uma mistura de RNAs de indivíduos do mesmo grupo, para obtenção da quantidade de RNA necessária para o sequenciamento. Uma vez obtido o resultado, a análise entre os grupos revelou uma lista de miRNAs diferencialmente expressos. Dentre eles, optamos por estudar mais detalhadamente neste trabalho o miR-142-5p, que demonstrou expressão aumentada no grupo LA quando comparado com o TN.

3.3.2 ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DE VIAS

A predição de alvos de miRNAs e vias de sinalização no qual eles estão envolvidos foi realizada utilizando o *Diana Tools microT-CDS* (RECZKO et al., 2012; PARASKEVOPOULOU et al., 2013) e mirPath v.3 (VLACHOS et al., 2015). Esta metodologia foi utilizada para ajudar na escolha do miRNA que seria estudado neste trabalho.

3.3.3 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA, SEGUIDA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (RT-qPCR)

Foi realizada a transformação de RNA em cDNA através da reação de transcriptase reversa, seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR – *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) utilizando o kit *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, USA).

Para as reações, foi adicionado 10µL de RNA total a uma mistura de reagentes nas seguintes concentrações: 1.25mM dNTPs (com dTTP), 3.75 U/µL de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*, 1x de *Reverse Transcription Buffer*, 0.25 U/µL de inibidor de RNase, 0.125x de *primer has-miR-142-5p* e *cel-miR-39*, para um volume final de 20µL. As reações de RT-PCR foram realizadas em um termociclador Eppendorf 5331 MasterCycler Gradient Thermal Cycler (Eppendorf, DE) utilizando as seguintes especificações: 25°C por 10min, 37°C por 2h e 85°C por 5min. O controle negativo da reação foi formado por todos os reagentes e água DEPC em substituto do RNA

Após obtido o cDNA, foi realizada a quantificação por PCR em tempo real (qPCR). As amostras de cDNA foram diluídas 1:5 e então 9 µL foram adicionados às seguintes concentrações de reagentes: 1x *Taqman Universal PCR Master Mix II (no UNG)*, 1x *Taqman Small RNA assay* (individualmente), para um volume final de 20µL, que foram distribuídos em triplicatas de 5µL em placas de 384 poços (Applied Biosystems, USA) e seladas utilizando filme adesivo óptico da mesma marca. A reação foi colocada no equipamento *ViiA 7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, USA), seguindo o protocolo: 50°C por 5 min, 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 60 seg.

O controle negativo da reação do cDNA, juntamente com um controle negativo da reação de qPCR foram utilizados para garantir que não havia contaminação durante a RT-PCR e a qPCR, respectivamente. Foi utilizada uma amostra de cDNA da linhagem celular BT-474 como amostra calibradora para pacientes e controles, por apresentar expressão detectável do miR-142-5p, após um teste realizado previamente no laboratório.

O limite de desvio padrão (SD – *Standard Deviation*) adotado entre ensaios e dentro deles foi de 0.5. A quantidade relativa (RQ – *Relative Quantification*) da expressão de miRNA foi calculada utilizando o método de comparação do *threshold* de ciclos ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001), onde $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizado para os níveis de *cel-miR-39* em EVs (controle exógeno adicionado durante a extração de RNA como forma de padronização da quantidade de miRNA). Os níveis de ΔCt (expressão do miRNA-alvo – expressão de *cel-miR-39*) das amostras foram comparados aos das amostras calibradoras. Todos os cálculos de ΔCt e RQ foram realizados utilizando o

QuantStudio Real-Time PCR Software v1.3 (Applied Biosystems, USA).

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.4.1 RT-qPCR E DADOS CLINICOPATOLÓGICOS

Os dados de RQ do VE-miRNA foram comparados entre os grupos controle e câncer, bem como entre os subtipos e o controle, além de ter sido contrastado contra os parâmetros clínicopatológicos idade, tamanho de tumor, grau do tumor e presença de metástases em linfonodos. Todos os dados foram testados, e rejeitados, para normalidade (*D'Agostino & Pearson omnibus* e *Shapiro-Wilk*) e homogeneidade de variâncias (*Brown-Forsythe*). Dessa forma, foram empregados testes estatísticos não paramétricos. Para comparações entre dois grupos foi utilizado o teste de Mann Whitney, e para comparação entre 3 grupos o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltiplas de Dunn. O p ajustado <0.05 foi considerado significativo. Todos os testes e gráficos foram feitos utilizando o programa *GraphPad Prism 6* (GraphPad Software Inc, USA)

3.4.2 ANÁLISE DE CURVAS ROC (*RECIEVER OPERATING CHARACTERISTIC*)

As curvas ROC foram calculadas para determinar o potencial diagnóstico do miR-142-5p. O cálculo da curva ROC foi realizado baseado nos valores de RQ. Os valores de corte, sensibilidade e especificidade foram calculados utilizando o índice de Youden ((sensibilidade + especificidade) – 100), baseados em valores fornecidos pelo programa *GraphPad Prism 6*. Quanto maior o valor do índice de Youden, melhor a combinação de sensibilidade e especificidade. No entanto, clinicamente valores altos de um em detrimento do outro não são ideais, então foram considerados os maiores valores para ambos os parâmetros, baseado no índice de Youden.

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS VEs

4.1.1 CARACTERIZAÇÃO POR ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS (NTA)

O isolamento das VEs no soro foi realizado utilizando um método de precipitação por kit. Foi possível constatar a presença de vesículas nas amostras através do NTA, comprovando a eficiência do kit de extração. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na média, moda e concentração entre os grupos LA, TN e CT de amostras na análise de NTA. A população de VEs isolada apresentou ao todo, médias de tamanho, moda e concentração de 140nm, 127nm e $1,37 \times 10^9$ partículas/mL, respectivamente, mostrando-se de acordo com o tamanho esperado (50-200 nm) para os exossomos. O quadro 3 mostra os valores da média, moda e concentração das 15 amostras, divididas em grupos controle (CT), luminal (LA) e triplo negativo (TN) e as figuras 6, 7 e 8 mostram os gráficos de concentração e tamanho para cada grupo de amostras individualmente.

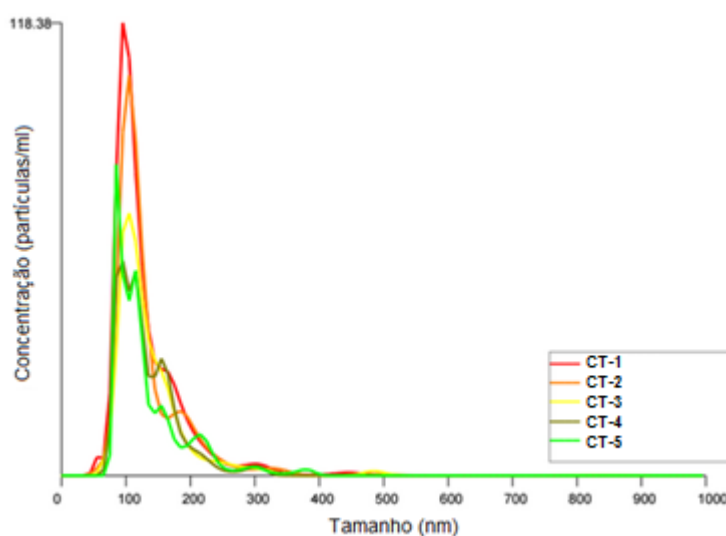
QUADRO 3 – RESULTADO DA ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS (NTA)

Amostra	Média	Moda	Concentração
CT 01	128.0 nm	99.6 nm	5.37e+008+/-5.59e+007 partículas/ml
CT 02	122.1 nm	98.9 nm	9.59e+008+/-6.08e+007 partículas/ml
CT 03	147.6 nm	127.1 nm	1.76e+009 +/- 2.52e+008 partículas/ml
CT 04	130.9 nm	131.9 nm	1.27e+009 +/- 1.85e+007 partículas/ml
CT 05	120.8 nm	110.5 nm	2.58e+009 +/- 3.48e+008 partículas/ml
LA 11	200.8 nm	237.8 nm	2.12e+009 +/- 3.50e+008 partículas/ml
LA 12	146.3 nm	117.3 nm	1.89e+009 +/- 1.69e+008 partículas/ml
LA 13	123.2 nm	132.7 nm	2.13e+009 +/- 2.29e+008 partículas/ml
LA 14	143.6 nm	143.8 nm	1.86e+009 +/- 1.63e+008 partículas/ml
LA 15	152.6 nm	131.9 nm	3.44e+008 +/- 6.73e+007 partículas/ml
TN 21	117.0 nm	96.3 nm	9.73e+008 +/- 7.87e+007 partículas/ml
TN 22	146. 8 nm	127.6 nm	1.65e+009 +/- 6.26e+007 partículas/ml
TN 23	152.3 nm	124.5 nm	9.66e+008 +/- 4.20e+007 partículas/ml
TN 24	152.7 nm	133.8 nm	8.05e+008 +/- 1.05e+008 partículas/ml
TN 25	119.5 nm	86.2 nm	6.93e+008 +/- 9.53e+007 partículas/ml

FONTE: O autor (2018)

LEGENDA: CT, controle. LA, luminal A. TN, triplo negativo.

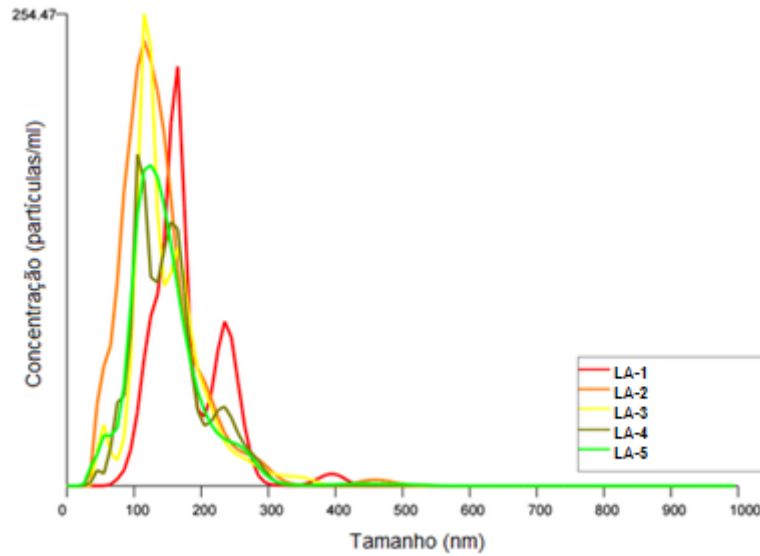
FIGURA 6: Gráfico de concentração x tamanho para as amostras do grupo controle (CT)



FONTE: O autor (2018)

LEGENDA: no gráfico de concentração x tamanho das VEs encontradas no NTA para o grupo controle, o pico mostra que as vesículas possuem tamanho entre 100-200nm,

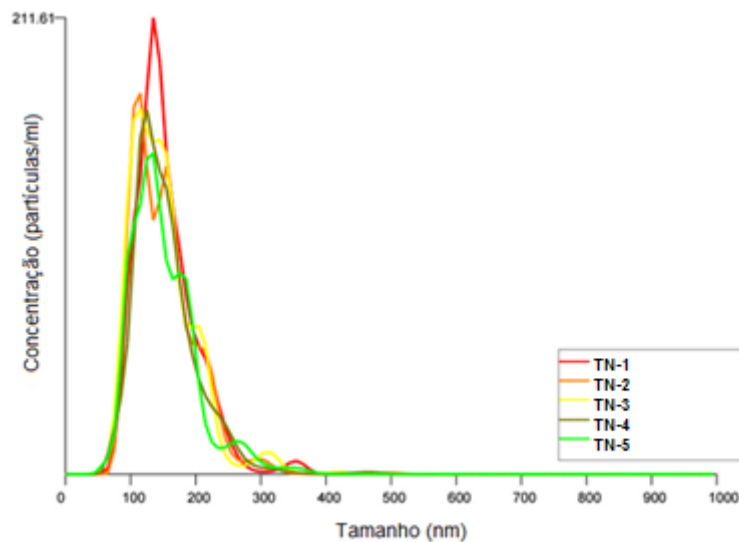
FIGURA 7: Gráfico de concentração x tamanho para as amostras do grupo luminal A (LA)



FONTE: O autor (2018)

LEGENDA: no gráfico de concentração x tamanho das VEs encontradas no NTA para o grupo luminal A, o pico mostra que as vesículas possuem tamanho entre 100-200nm,

FIGURA 8: Gráfico de concentração x tamanho para as amostras do grupo triplo negativo (TN)



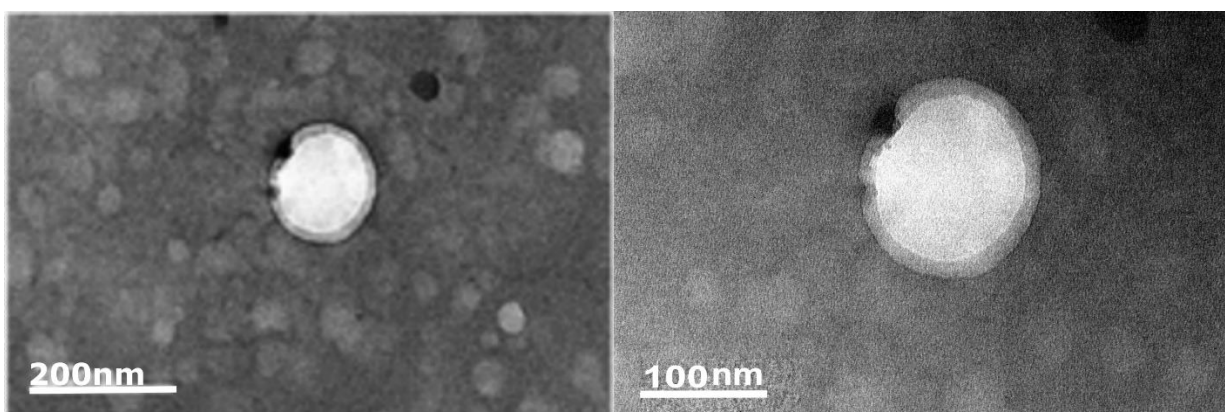
FONTE: O autor (2018)

LEGENDA: no gráfico de concentração x tamanho das VEs encontradas no NTA para o grupo triplo negativo, o pico mostra que as vesículas possuem tamanho entre 100-200nm,

4.1.2 CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM)

Uma vez que não foi observada diferença no tamanho das vesículas entre os grupos CT, LA e TN no NTA, a microscopia eletrônica de transmissão foi realizada apenas para a amostra de câncer (LA+TN). Os resultados da microscopia revelaram que o tamanho das vesículas observadas era de cerca de 200 nm, correspondendo ao tamanho encontrado no NTA. (Figura 9).

FIGURA 9: Imagem TEM dos EVs do paciente com câncer



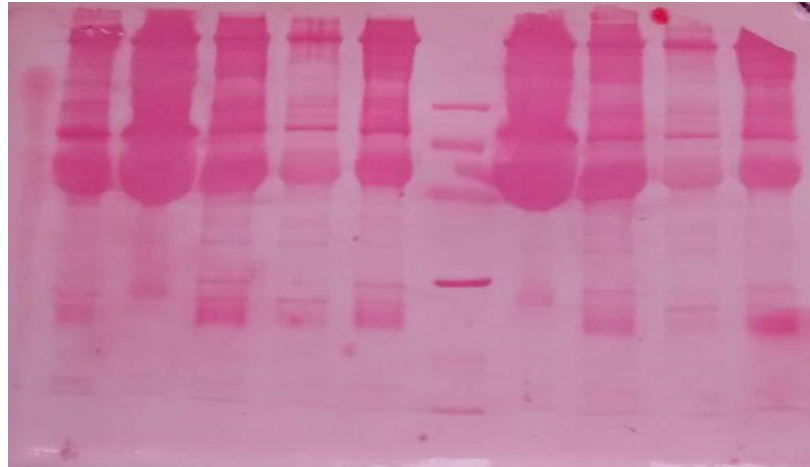
FONTE: O autor (2018)

LEGENDA: imagem obtida da microscopia eletrônica de transmissão (TEM), mostrando que o tamanho das VEs encontradas corresponde ao encontrado no NTA (100-200nm)

4.1.3 CARACTERIZAÇÃO POR WB

A quantificação das proteínas obtidas das VEs foi realizada através de ensaio de Bradford. Também foi possível observar que a quantidade de proteínas obtidas foi satisfatória (Figura 10).

FIGURA 10: Membrana de nitrocelulose corada com Ponceau evidenciando a presença de proteínas

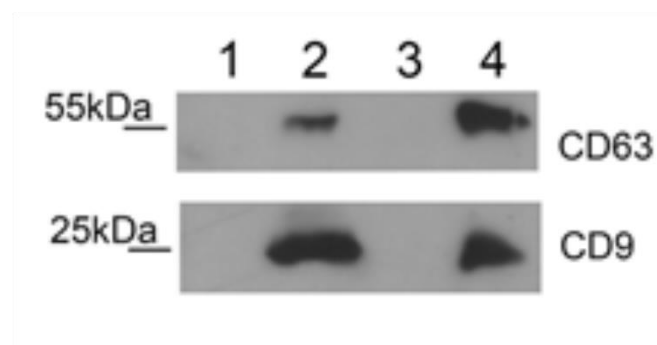


FONTE: O autor (2018)

LEGENDA: membrana de nitrocelulose obtida após a transferência do gel de poliacrilamida, corada com Ponceau, mostra a marcação das proteínas obtidas.

Após a transferência do gel para a membrana de nitrocelulose, foi possível observar grande quantidade das proteínas de interesse relacionadas às VEs (CD9 e CD63) nos extratos de vesículas (2 e 4) (Figura 11), não sendo detectados no sobrenadante depletado de exossomos (1 e 3) tanto em pacientes quanto controles, o que indica que o kit foi eficiente no enriquecimento das amostras de soro com exossomos.

FIGURA 11: Análise de WB mostrando expressão proteica de CD9 e CD63



FONTE: O autor (2018)

Legenda: Western blotting revelado em filme fotográfico evidenciando as proteínas CD9 e CD63 encontradas nos grupos controle e câncer. Os grupos correspondem a: 1: sobrenadante depletado controle; 2: VEs de controle; 3: sobrenadante depletado de câncer; 4: VEs de câncer.

4.2 miRNAs IDENTIFICADOS NO RNAseq

Entre os miRNAs encontrados no sequenciamento, alguns estavam diferencialmente expressos entre os grupos LA, TN e CT. O miR-142-5p foi identificado com uma expressão aumentada no grupo LA quando comparado com o grupo TN, com um *fold change* de 1.85 (Quadro 4). Esse miRNA foi escolhido por já ter sido reportado como diferencialmente expresso em outros tipos de câncer, mas ainda ser pouco estudado no câncer de mama.

QUADRO 4: miRNAs com maior diferença de expressão identificados no RNAseq na comparação do grupo Luminal A (LA) com o Triplo Negativo (TN)

LA vs TN	VE-miRNAs	log2 FC	padj
	hsa-miR-4433b-5p	2.233	2.52E-05
	hsa-miR-26a-5p	1.768	8.62E-03
	<u>hsa-miR-142-5p</u>	<u>1.853</u>	<u>1.83E-02</u>
	hsa-let-7f-5p	-1.114	3.77E-02
	hsa-miR-484	1.275	3.77E-02
	hsa-miR-486-5p	1.252	4.17E-02
	hsa-miR-15b-5p	2.39	4.77E-02

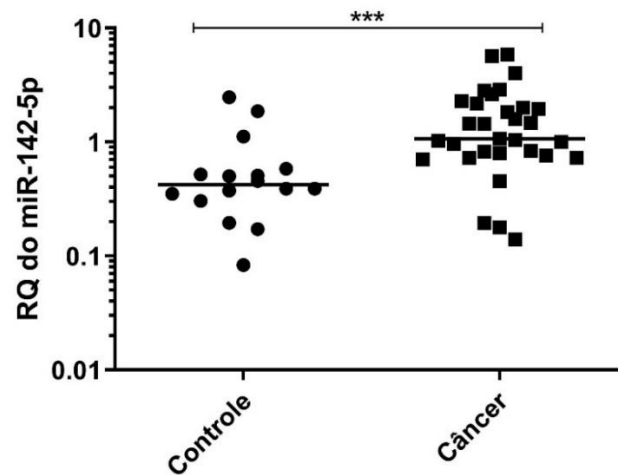
FONTE: O autor (2018)

Legenda: Este quadro mostra os miRNAs derivados de vesículas extracelulares (VE-miRNAs) encontrados diferencialmente expressos no sequenciamento, ao comparar o grupo LA com o grupo TN com o miR-142-5p destacado por ser o objeto desse estudo. FC (*fold change*), padj: p ajustado

4.3 EXPRESSÃO DO miR-142-5p POR RT-qPCR

O sequenciamento se baseou na quantificação de VE-miRNAs obtido de *pools* das amostras LA, TN e CT. Para testar se esse padrão observado no sequenciamento também poderia ser observado em amostras individuais de pacientes, o RT-qPCR foi realizado. Os resultados mostraram que o nível de expressão do miR-142-5p se apresentou significativamente diferente entre o grupo controle e o câncer (LA+TN) ($p < 0,0001$) (Figura 12), com maior expressão no grupo com câncer.

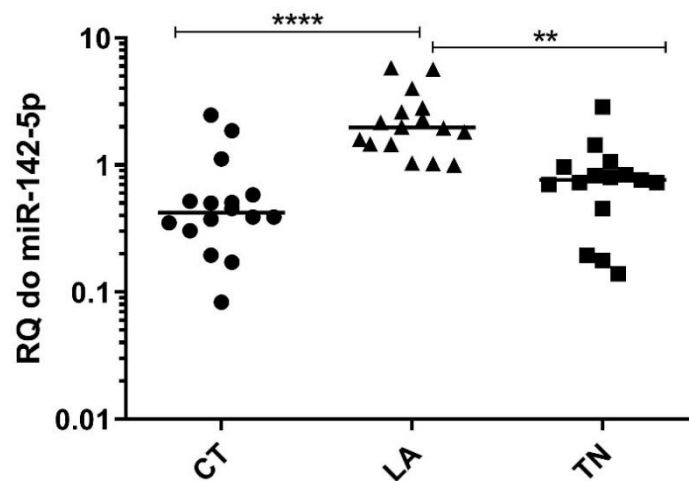
FIGURA 12: expressão do miR-142-5p em amostras de pacientes com câncer e controles



FONTE: O autor (2018)

A análise de subtipo (Figura 13) mostrou que o miR-142-5p derivado de VEs apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com o maior nível de expressão se apresentando no subtipo LA ($p < 0,0001$).

FIGURA 13: expressão do miR-142-5p em amostras de pacientes controle e câncer



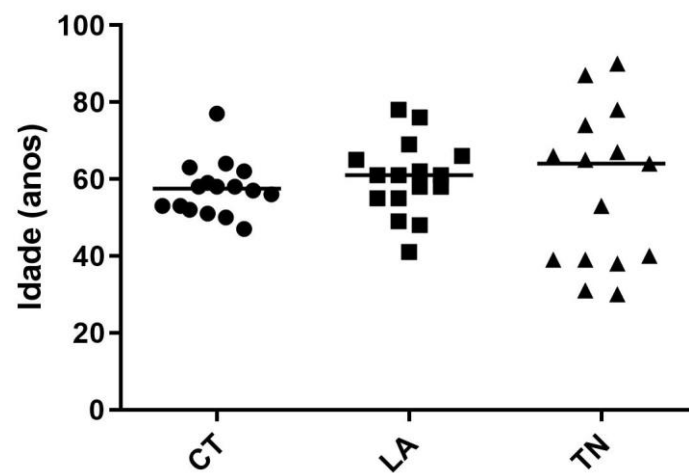
FONTE: O autor (2018)

4.4 EXPRESSÃO DO miR-142-5p E PARÂMETROS CLINICOPATOLÓGICOS

Os parâmetros clinicopatológicos analisados foram idade, tamanho do tumor, grau do tumor, metástase de linfonodo, receptor de estrogênio,

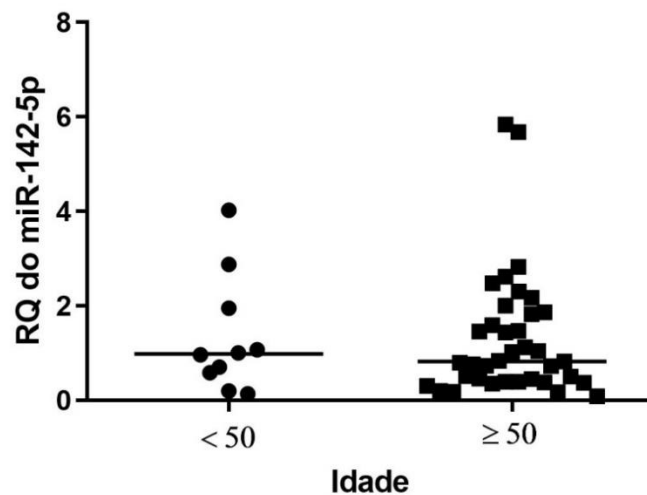
receptor de progesterona e expressão de HER2. A comparação entre esses parâmetros e os dados de expressão do miR-142-5p mostraram que não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos CT, LA e TN com relação a idade das pacientes (figura 14) e também com relação a expressão do miR-142-5p (figura 15).

FIGURA 14: Comparação das idades das pacientes com relação ao subtipo de câncer de mama



FONTE: O autor (2018)

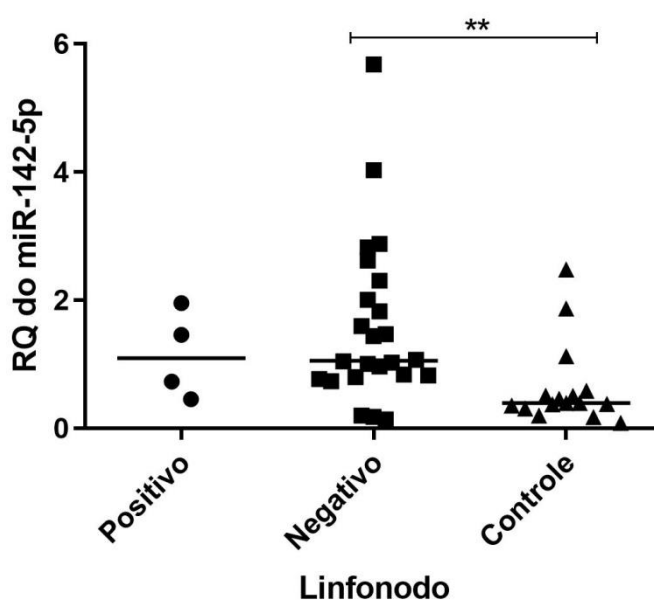
FIGURA 15: Comparação de idade das pacientes com relação à expressão do miR-142-5p



FONTE: O autor (2018)

Não houve diferença na expressão do miR-142-5p entre pacientes positivos e negativos para metástase no linfonodo, porém a expressão do miR-142-5p se mostrou mais elevada em pacientes negativos do que nos controles ($p<0,01$) (figura 16).

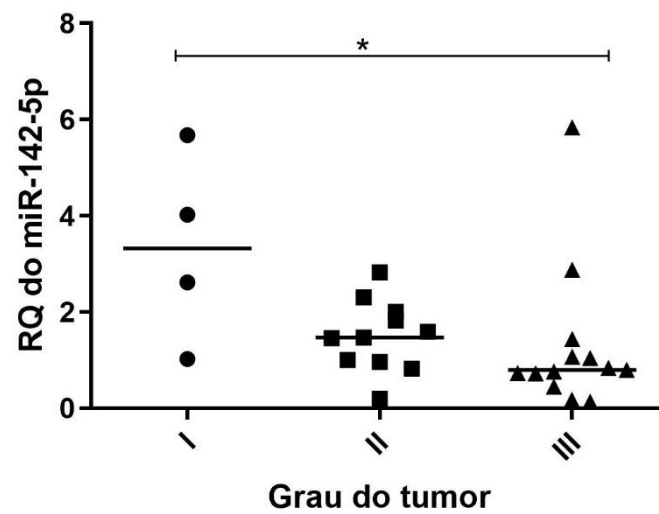
FIGURA 16: Comparação da expressão do miR-142-5p entre pacientes com metástase positiva ou negativa em linfonodos e controles.



FONTE: O autor (2018)

Em relação ao grau do tumor, foi possível verificar que a expressão do miR-142-5p diminui significativamente conforme a progressão do grau do tumor ($p<0,05$) (figura 17).

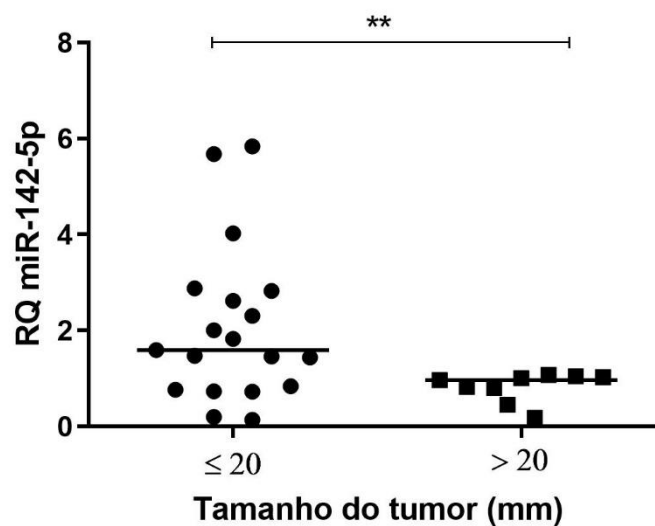
FIGURA 17: Expressão do miR-142-5p em relação ao grau do tumor



FONTE: O autor (2018)

Também foi possível observar diferenças de expressão do miR-142-5p em relação ao parâmetro tamanho do tumor. Tumores maiores (>20mm) aparentam ter uma redução significativa no nível de expressão do miR-142-5p em comparação a tumores menores (≤ 20 mm) ($p < 0,01$), conforme mostrado na figura 18.

FIGURA 18: Expressão do miR-142-5p em relação ao tamanho do tumor



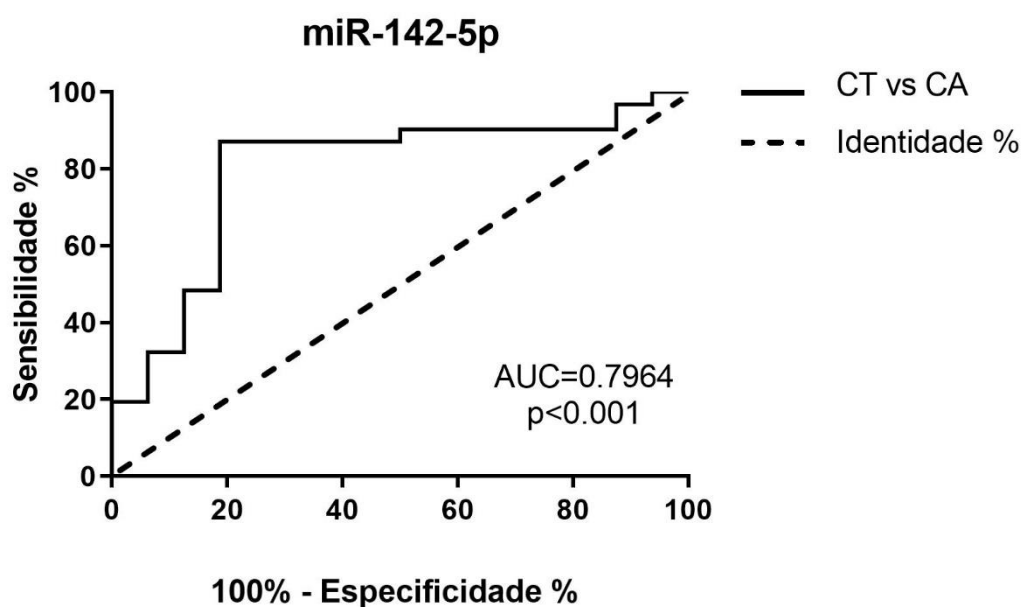
FONTE: O autor (2018)

4.5 POTENCIAL DIAGNÓSTICO DO miR-142-5p

O passo seguinte foi testar o potencial do miR-142-5p para diagnóstico do câncer de mama e seus subtipos (LA e TN). Foram construídas curvas ROC para medir a precisão com a qual esse miRNA é capaz de atuar como biomarcador de diagnóstico. Quanto mais próximo os valores de AUC estiverem de 1, maior será a precisão do teste.

O miR-142-5p apresentou uma acurácia para o diagnóstico de pacientes com câncer de mama (CT vs CA) de 0,7964, com sensibilidade de 87,10% e especificidade de 81,25% para o cutoff de 0,6435 (figura 19).

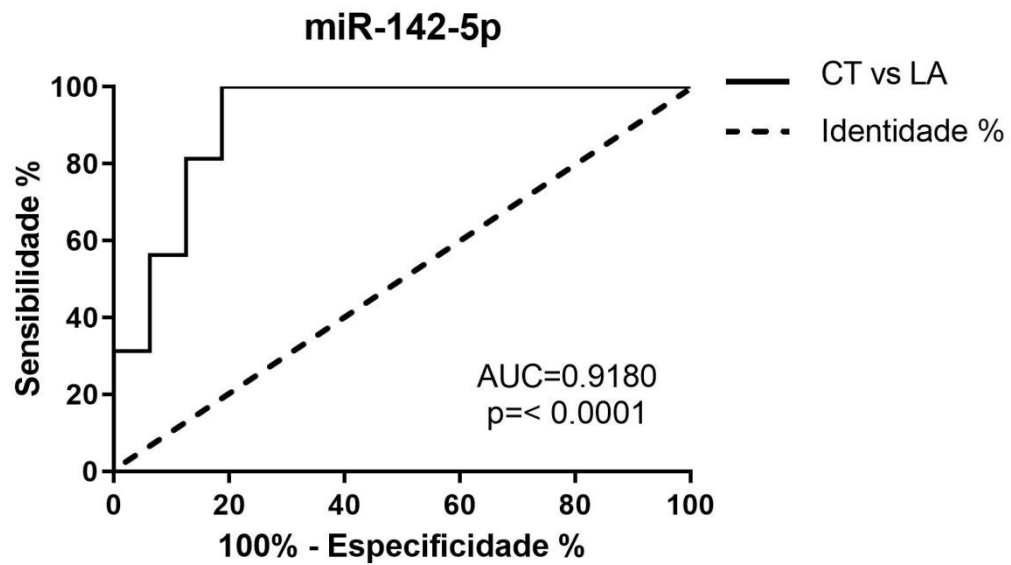
FIGURA 19: Precisão do diagnóstico de câncer de mama calculada para o miR-142-5p



FONTE: O autor (2018)

Esse miRNA também mostrou grande potencial para identificar pacientes LA quando comparados com controles (figura 20), apresentando acurácia de 0,9180, e apresentando 100% de sensibilidade e 81,25% de especificidade para o cutoff de 0,7926.

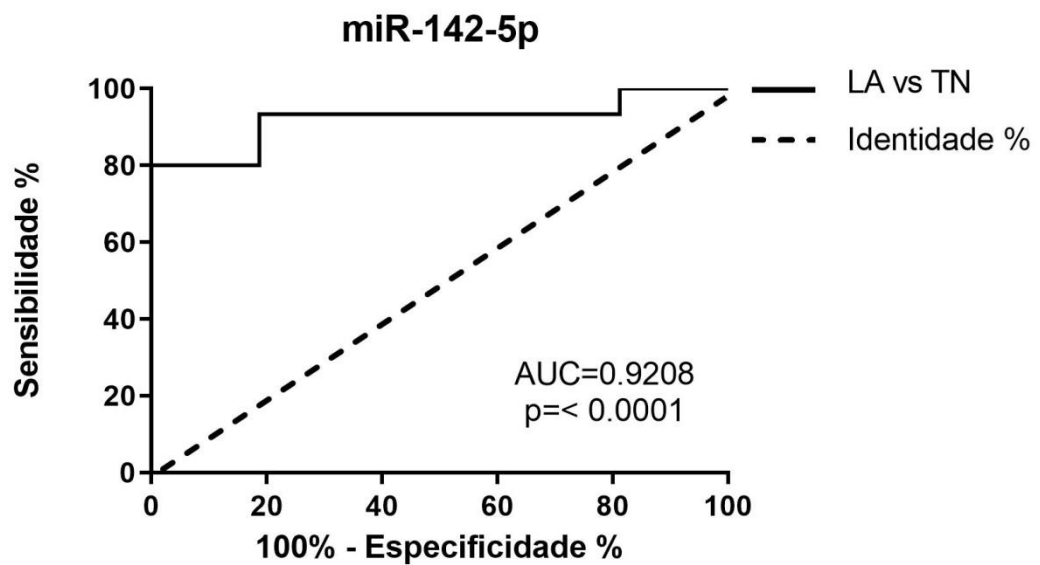
FIGURA 20: Precisão no diagnóstico de pacientes LA quando comparado com CT, utilizando a expressão do miR-142-5p



FONTE: O autor (2018)

O miR-142-5p também apresentou excelentes valores para a diferenciação entre os subtipos LA e TN, com acurácia de 0,9208, valor *cutoff* de 0,6435 e apresentando 87,10% de sensibilidade e 81,25% de especificidade (figura 21).

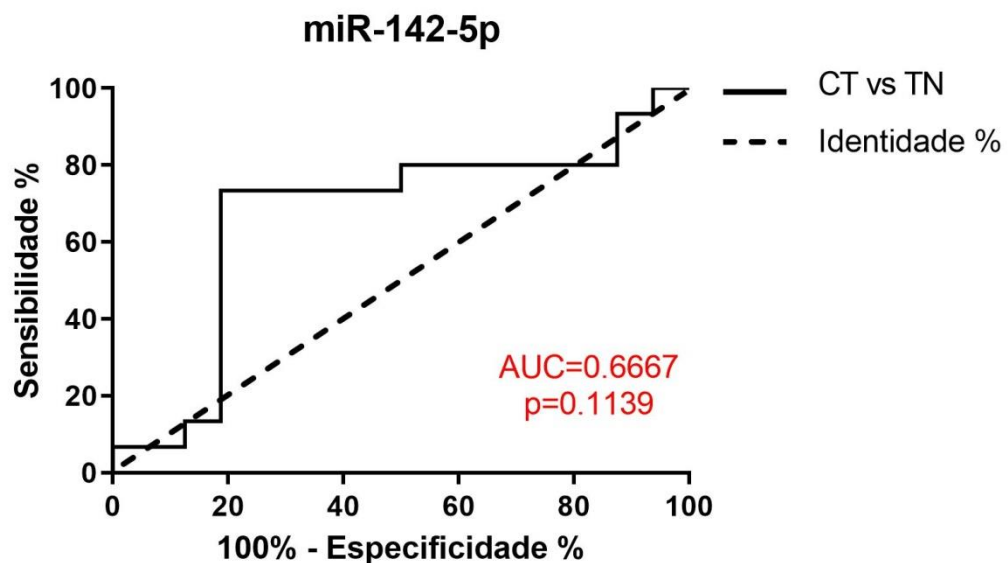
FIGURA 21: Precisão no diagnóstico de pacientes LA quando comparados com o subtipo TN, utilizando a expressão do miR-142-5p



Fonte: O autor (2018)

O miR-142-5p porém não se mostrou eficiente em diagnosticar o câncer de mama triplo negativo em comparação aos controles, apresentando uma acurácia de apenas 0,6667 (figura 22).

FIGURA 22: Precisão no diagnóstico de pacientes TN quando comparadas com CT, utilizando a expressão do miR-142-5p



FONTE: O autor (2018)

4.6 ANÁLISE DAS VIAS KEGG PARA O miR-142-5p

A análise de vias KEGG obtidas no programa *Diana Tools* para o miR-142-5p (quadro 5) mostrou que esse miRNA pode estar relacionado à carcinomas celulares renais, via de sinalização p53, gliomas, câncer de próstata, carcinogênese viral e microRNAs no câncer. Isso é interessante pois evidencia que o miR-142-5p pode ser relevante no câncer. Além disso, ele também pode estar relacionado à vias de sinalização como a do p53, que está associada com a agressividade tumoral, resistência à quimioterapia e recidiva (Bandoh *et al*, 2002); e também à biossíntese do N-glicano, associada à progressão em câncer (Lau e Dennis, 2008).

QUADRO 5: Análise da via de sinalização KEGG para o miR-142-5p

KEGG pathway	Valor de p	Genes
Carcinoma de células renais	0.00207197159388	8
Via de sinalização do p53	0.00348311446124	10
Glioma	0.00348311446124	8
biossíntese de N-glicano	0.0073092450224	3
Proteólise mediada pela ubiquitina	0.0073092450224	14
Câncer de próstata	0.0127072369977	10
Ciclo celular	0.0222058374911	12
Carcinogênese viral	0.0222058374911	15
Via das Pentose Fosfato	0.0259887791236	3
MicroRNAs em câncer	0.0259887791236	14
Degradação de Glicosaminoglicanos	0.0263974035483	2

FONTE: O autor (2018)

5. DISCUSSÃO

A busca por melhores métodos de diagnóstico para doenças como o câncer tem sido um dos principais focos de pesquisadores da área nos últimos anos. No caso do câncer de mama, a mamografia é atualmente o padrão ouro para o diagnóstico. Contudo sua acurácia muitas vezes é limitada pelo fato de possuir alta especificidade (acima de 95%), mas associada à uma baixa sensibilidade (67%), o que frequentemente implica em diagnósticos falso-negativos. Dessa forma, o exame possui uma baixa capacidade de distinguir entre tumores benignos ou malignos, levando a paciente a ter que passar por métodos invasivos de detecção como as biópsias (Utzon-frank *et al.* 2011).

É nesse cenário que os biomarcadores surgiriam como um modo de complementar o exame da mamografia. Por muitos anos, pesquisadores da área vem buscando possíveis biomarcadores com alta especificidade e sensibilidade para serem usados na biópsia líquida e uma das moléculas que mais chama atenção para esse fim são os miRNAs. Isso devido a sua estabilidade em fluídos biológicos (ARROYO, *et al.* 2011) e a facilidade com a qual podem ser obtidos através de métodos pouco invasivos e que causam o mínimo de desconforto e risco ao paciente.

Os miRNAs derivados de VEs teriam uma vantagem adicional, uma vez que estudos apontam que o carregamento dessas vesículas com miRNAs não é um processo aleatório e que sua seleção difere conforme a célula de origem e condições fisiológicas, que incluem processos cancerígenos (BHOME *et al.* 2018; KAHLERT e KALLURI, 2013). Existem diversos tipos de VEs e neste estudo, a sua caracterização mostrou um enriquecimento de exossomos, evidenciado pelo tamanho e pela expressão de proteínas características na população de VEs isoladas. A vantagem de utilizar miRNAs em conjunto com a mamografia, seria uma compensação a baixa sensibilidade desse exame, fato evidenciado pelos resultados deste trabalho.

Nesse estudo foi demonstrado que o miR-142-5p possui maior expressão em indivíduos com câncer quando comparados a indivíduos controle, o que pode permitir a distinção entre esses dois grupos com eficácia. Além disso, esse miRNA também mostrou expressão aumentada para diferentes subtipos de câncer de mama, em especial o LA. Essa diferença de

expressão mostra o potencial do miR-142-5p para ser usado como um biomarcador para a detecção de câncer de mama e para diferenciar os subtipos entre si, com ênfase para o LA, corroborando os dados do sequenciamento (OZAWA, 2018). Isso poderia levar a um melhor diagnóstico e a um tratamento mais direcionado e específico para o subtipo, resultando em uma melhor sobrevida.

A distinção de subtipos é de extrema importância para melhor escolher as terapias que serão utilizadas, garantindo maior sobrevida para a paciente. Um exemplo disso, é o estudo de Sparano e colaboradores (2018) no qual cerca de 10 mil mulheres com câncer de mama hormonal positivo, com HER2 negativo e sem metástase em linfonodos foram submetidas a um teste comercial que analisa a atividade de 21 genes para prever a probabilidade de benefício da quimioterapia e o risco de recorrência em 5 anos (Oncotype DX®). O resultado desse estudo mostrou que determinados pacientes não obtinham aumento da sobrevida com a quimioterapia associada à tratamentos hormonais (SPARANO *et al.*, 2018), o que demonstra que muitas pacientes que possuem esse subtipo de câncer de mama podem estar recebendo quimioterapia desnecessariamente, cuja retirada evitaria seus efeitos colaterais e traria melhorias ao seu bem-estar.

Observou-se também que o miR-142-5p não variava sua expressão de acordo com a idade, nem com a positividade de linfonodos para metástase, embora a alta expressão desse miRNA já tenha sido associado à presença de metástases no linfonodo (WANG *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2018). No entanto apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) com a progressão do grau do tumor e também com tumores maiores de 20mm ($p < 0,01$), características não descritas até então.

Esse miRNA foi escolhido para estudo por já ter sido encontrado em pesquisas sobre câncer (YANG *et al.*, 2016; KOGURE *et al.*, 2011) e também como diferencialmente expresso no RNAseq de VE de um estudo anterior realizado no LabCHO (Ozawa, 2018), com poucas pesquisas na área do câncer de mama. Em geral, o miR-142-5p se apresenta bastante contraditório dependendo do tipo de câncer em que é observado. Em estudos sobre câncer colorretal (ISLAM *et al.*, 2018) e carcinoma epidermóide cutâneo (BAI *et al.*, 2017), ele é considerado um oncogene, porém, em câncer de pâncreas (JIA

et al., 2017) e câncer de pulmão de células não pequenas (WANG *et al.*, 2017), ele age como um supressor tumoral. Contudo, um estudo recente mostrou que no câncer de mama, o miR-142-5p atua como um oncogene, o que condiz com as observações feitas nesse estudo (XU e WANG, 2018).

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível observar que o miR-142-5p se apresentou um alvo de grande interesse no estudo sobre VE-miRNAs e possui bom potencial para ser usado como biomarcador para biópsia líquida no câncer de mama, em especial para o subtipo LA. O uso deste VE-miRNA como biomarcador na biópsia líquida é de grande interesse por ser um método pouco invasivo, o que facilita a obtenção e análise, podendo impactar positivamente no diagnóstico e escolha da terapia adequada para cada paciente.

7. REFERÊNCIAS

AALBERTS, M. et al. Identification of Distinct Populations of Prostatasomes That Differentially Express Prostate Stem Cell Antigen, Annexin A1, and GLIPR2 in Humans¹. **Biology Of Reproduction**, v. 86, n. 3, p.1-8, 2012.

ABCAM. **Extracellular vesicles: an introduction**. Disponível em: <<https://www.abcam.com/primary-antibodies/extracellular-vesicles-an-introduction>>. Acesso em: 03 mai. 2018.

ADMYRE C.; JOHANSSON, S. M.; QAZI, K. R.; FILEN, J. J.; LAHESMAA, R.; NORMAN, M.; NEVE, E. P.; SCHEYNIUS, A.; GABRIELSSON, S. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. **Journal of Immunology**, v. 179, p. 1969-78, 2007.

AHMED, Khawaja Ashfaque; XIANG, Jim. Mechanisms of cellular communication through intercellular protein transfer. **Journal Of Cellular And Molecular Medicine**, v. 15, n. 7, p.1458-1473, 2010.

ALLURI, Prasanna; NEWMAN, Lisa A.. Basal-Like and Triple-Negative Breast Cancers. **Surgical Oncology Clinics Of North America**, v. 23, n. 3, p.567-577, 2014.

ARROYO J. D.; CHEVILLET, J. R.; KROH, E. M.; RUF, I. K.; PRITCHARD, C. C.; GIBSON, D. F.; MITCHELL, P. S.; BENNETT, C. F.; POGOSOVA-AGADJANYAN, E. L.; STIREWALT, D. L.; TAIT, J. F.; TEWARI, M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 108, p. 5003-8, 2011.

ASEA, A. et al. Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. **Journal Of Reproductive Immunology**, v. 79, n. 1, p.12-17, 2008.

BAI, Xinping et al. MicroRNA-142-5p induces cancer stem cell-like properties of cutaneous squamous cell carcinoma via inhibiting PTEN. **Journal Of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 2, p.2179-2188, 2017.

BANDO, Nobuyuki et al. Prognostic value of p53 mutations, bax, and spontaneous apoptosis in maxillary sinus squamous cell carcinoma. **Cancer**, v. 94, n. 7, p.1968-1980, 2002.

BATEMAN, A.C. Breast pathology. **Surgery**, v.25, n.6, p.245-250, 2007.

BELLINGHAM, Shayne A. et al. Exosomes: Vehicles for the Transfer of Toxic Proteins Associated with Neurodegenerative Diseases?. **Frontiers In Physiology**, v. 3, p.1-12, 2012.

BHOME, Rahul et al. Exosomal microRNAs (exomiRs): Small molecules with a big role in cancer. **Cancer Letters**, v. 420, p.228-235, 2018.

BLOOM H. J.; RICHARDSON, W. W. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. **British Journal of Cancer**, Place Published, v. 11, p. 359-77, 1957.

BOISSERIE-LACROIX, M. et al. Correlation between imaging and prognostic factors: Molecular classification of breast cancers. **Diagnostic And Interventional Imaging**, v. 95, n. 2, p.227-233, 2014.

BORGES, F.T.; REIS, L.A.; SCHOR, N. Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 46, n. 10, p.824-830, 2013

BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Cancer Journal for Clinicians**, p.1-31, 2018.

BUZAS, Edit I. et al. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 6, p.356-364, 2014.

CABY M. P.; LANKAR, D.; VINCENDEAU-SCHERRER, C.; RAPOSO, G.; BONNEROT, C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. **International Immunology**, v. 17, p. 879-87, 2005.

CAMUSSI, Giovanni et al. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. **Kidney International**, v. 78, n. 9, p.838-848, 2010.

CHEN W. X.; CAI, Y. Q.; LV, M. M.; CHEN, L.; ZHONG, S. L.; MA, T. F.; ZHAO, J. H.; TANG, J. H. Exosomes from docetaxel-resistant breast cancer cells alter chemosensitivity by delivering microRNAs. **Tumour Biology**, v. 35, p. 9649-59, 2014.

CHEN, Jie; HU, Chengping; PAN, Pinhua. Extracellular Vesicle MicroRNA Transfer in Lung Diseases. **Frontiers In Physiology**, v. 8, p.1-9, 2017.

CHIEN, Hung-yu et al. Circulating microRNA as a diagnostic marker in populations with type 2 diabetes mellitus and diabetic complications. **Journal Of The Chinese Medical Association**, v. 78, n. 4, p.204-211, 2015.

CREEMERS, Esther E.; TIJSEN, Anke J.; PINTO, Yigal M.. Circulating MicroRNAs. **Circulation Research**, v. 110, n. 3, p.483-495, 2012.

CROWLEY, E. et al. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 10, n. 8, p.472-484, 2013.

DEJIMA, Hitoshi et al. Exosomal microRNA in plasma as a non-invasive biomarker for the recurrence of non-small cell lung cancer. **Oncology Letters**, v. 13, n. 3, p.1256-1263, 2017.

D'SOUZA-SCHOREY, C.; CLANCY, J. W.. Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. **Genes & Development**, v. 26, n. 12, p.1287-1299, 2012

EICHELSER, C. et al. Increased serum levels of circulating exosomal microRNA-373 in receptor-negative breast cancer patients. **Oncotarget**, v. 5, n. 20, p.9650-9663, 2014.

ELSTON C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, p. 403-10, 1991.

FARMER, Hannah et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. **Nature**, v. 434, n. 7035, p.917-921, 2005.

FERMÍN, Mar-aguilar et al. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential breast cancer biomarkers. **Disease Markers**, v. 34, n. 3, p.163-169, 2013

FILIPOWICZ, W.; BHATTACHARYYA, S.N.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 2, p.102-114, 2008.

FRANÇA, N.R. et al. Interferência por RNA: uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 6, p.695-702, 2010.

GEEKIYANAGE, Hirosha et al. Blood serum miRNA: Non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease. **Experimental Neurology**, v. 235, n. 2, p.491-496, 2012.

GOLDHIRSCH, A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Annals Of Oncology**, v. 24, n. 9, p.2206-2223, 2013.

GOLDHIRSCH, A. et al. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Annals Of Oncology**, v. 22, n. 8, p.1736-1747, 2011.

GOULD, Stephen J.; RAPOSO, Graça. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. **Journal Of Extracellular Vesicles**, v. 2, n. 1, p.1-3, 2013.

GYORGY B.; SZABO, T. G.; PASZTOI, M.; PAL, Z.; MISJAK, P.; ARADI, B.; LASZLO, V.; PALLINGER, E.; PAP, E.; KITTEL, A.; NAGY, G.; FALUS, A.; BUZAS, E. I. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, p. 2667-88, 2011.

HANNAFON, B.N. et al. Plasma exosome microRNAs are indicative of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 18, n. 1, p.1-14, 2016.

HANNAFON, Bethany N. et al. Exosome-mediated microRNA signaling from breast cancer cells is altered by the anti-angiogenesis agent docosahexaenoic acid (DHA). **Molecular Cancer**, v. 14, n. 1, p.1-13, 2015.

HARDING C.; HEUSER, J.; STAHL, P. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. **European Journal of Cell Biology**, v. 35, p. 256-63, 1984.

HARDING C.; HEUSER, J.; STAHL, P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. **Journal of Cell Biology**, v. 97, p. 329-39, 1983.

HE, Lin; HANNON, Gregory J.. Erratum: MicroRNAs. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 7, p.522-531, 2004.

HENEGHAN, Helen M. et al. Circulating microRNAs as Novel Minimally Invasive Biomarkers for Breast Cancer. **Annals Of Surgery**, v. 251, n. 3, p.499-505, 2010.

HONDERMARCK, Hubert. Breast Cancer - When Proteomics Challenges Biological Complexity **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 2, n. 5, p.281-291, 2003.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro 2011. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2018

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. **Câncer: o que é**. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 03 mai. 2018.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. **Estimativa 2018 – Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 03 mai. 2018.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. **Fatores de Risco** Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama/fatores_risco> Acesso em: 03 mai.

2018

ISLAM, Farhadul et al. MiR-142-5p act as an oncogenic microRNA in colorectal cancer: Clinicopathological and functional insights. **Experimental And Molecular Pathology**, v. 104, n. 1, p.98-107, 2018.

JIA, Long et al. MiR-142-5p regulates tumor cell PD-L1 expression and enhances anti-tumor immunity. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 488, n. 2, p.425-431, 2017.

KAHLERT, Christoph; KALLURI, Raghu. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. **Journal Of Molecular Medicine**, v. 91, n. 4, p.431-437, 2013.

KOGURE, Takayuki et al. Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: A mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. **Hepatology**, v. 54, n. 4, p.1237-1248, 2011.

KRÜTZFELDT, J.; STOFFEL, M.. MicroRNAs: A new class of regulatory genes affecting metabolism. **Cell Metabolism**, v. 4, n. 1, p.9-12, 2006.

LAU, K. S; DENNIS, J. W. N-Glycans in cancer progression. **Glycobiology**, v. 18, n. 10, p.750-760, 2008.

LEWIS, B.P.; BURGE, C.B.; BARTEL, D.P.. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. **Cell**, v. 120, n. 1, p.15-20, 2005.

LIU, Y.; DU, J.; DENG, L.. Synthesis, Structure, and Reactivity of Low-Spin Cobalt(II) Imido Complexes [(Me₃P)₃Co(NAr)]. **Inorganic Chemistry**, v. 56, n. 14, p.8278-8286, 2017.

LOGOZZI M.; DE MILITO, A.; LUGINI, L.; BORCHI, M.; CALABRO, L.; SPADA, M.; PERDICCHIO, M.; MARINO, M. L.; FEDERICI, C.; IESSI, E.; BRAMBILLA, D.; VENTURI, G.; LOZUPONE, F.; SANTINAMI, M.; HUBER, V.; MAIO, M.; RIVOLTINI, L.; FAIS, S. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. **PLoS One**, v. 4, p. 1-10, 2009.

LÖTSCH, J.; OERTEL, B.G.; ULTSCH, A. Human models of pain for the prediction of clinical analgesia. **Pain**, v. 155, n. 10, p.2014-2021, 2014.

MA, Zhaowu et al. MicroRNA regulatory pathway analysis identifies miR-142-5p as a negative regulator of TGF- β pathway via targeting SMAD3. **Oncotarget**, v. 7, n. 44, p.71504-71513, 2016.

MANDOURAH, Abdullah Y. et al. Circulating microRNAs as potential diagnostic biomarkers for osteoporosis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p.1-10, 2018.

MASYUK, A.I. et al. Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory

mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. **American Journal Of Physiology-gastrointestinal And Liver Physiology**, v. 299, n. 4, p.990-999, 2010.

MATHIVANAN S.; JI, H.; SIMPSON, R. J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. **Journal of Proteomics**, v. 73, p. 1907-20, 2010.

MATHIVANAN S.; JI, H.; SIMPSON, R. J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. **Journal of Proteomics**, v. 73, p. 1907-20, 2010.

MITCHELL, P. S. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 105, n. 30, p.10513-10518, 2008.

MITTELBRUNN, Maria; SÁNCHEZ-MADRID, Francisco. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 5, p.328-335, 2012.

NILSSON J.; SKOG, J.; NORDSTRAND, A.; BARANOV, V.; MINCHEVA-NILSSON, L.; BREAKFIELD, X. O.; WIDMARK, A. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. **British Journal Cancer**, v. 100, p. 1603-7, 2009.

O'BRIEN K.; RANI, S.; CORCORAN, C.; WALLACE, R.; HUGHES, L.; FRIEL, A. M.; MCDONNELL, S.; CROWN, J.; RADOMSKI, M. W.; O'DRISCOLL, L. Exosomes from triple-negative breast cancer cells can transfer phenotypic traits representing their cells of origin to secondary cells. **European Journal of Cancer**, v. 49, p. 1845-59, 2013

OGAWA, Yuko et al. Proteomic Analysis of Two Types of Exosomes in Human Whole Saliva. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 1, p.13-23, 2011.

OZAWA, Patricia Midori Murobushi et al. Extracellular vesicles from triple-negative breast cancer cells promote proliferation and drug resistance in non-tumorigenic breast cells. **Breast Cancer Research And Treatment**, v. 172, n. 3, p.713-723, 2018.

PAN B. T.; JOHNSTONE, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. **Cell**, v. 33, p. 967-78, 1983

PAPADOPOULOS, G. L. et al. DIANA-mirPath: Integrating human and mouse microRNAs in pathways. **Bioinformatics**, v. 25, n. 15, p.1991-1993, 2009.

PARK, K.-H. et al. Ca²⁺ Signaling Tools Acquired from Prostatosomes Are Required for Progesterone-Induced Sperm Motility. **Science Signaling**, v. 4, n. 173, p.31-37, 2011.

PEROU, Charles M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p.747-752, 2000.

PISITKUN, T.; SHEN, R.-F.; KNEPPER, M. A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 101, n. 36, p.13368-13373, 2004.

POVERO, Davide et al. Circulating Extracellular Vesicles with Specific Proteome and Liver MicroRNAs Are Potential Biomarkers for Liver Injury in Experimental Fatty Liver Disease. **Plos One**, v. 9, n. 12, p.1-28, 2014.

RAKHA, E.A et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 4, p.1-12, 2010.

RAKHA, Emad A. et al. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. **Cancer**, v. 109, n. 1, p.25-32, 2007.

RONQUIST, G.; BRODY, I. The prostasome: its secretion and function in man. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 822, p. 203–218, 1985.

ROSER, Anna Elisa et al. Circulating miRNAs as Diagnostic Biomarkers for Parkinson's Disease. **Frontiers In Neuroscience**, v. 12, p.1-9, 2018.

SANGA, Sandeep et al. Gene expression meta-analysis supports existence of molecular apocrine breast cancer with a role for androgen receptor and implies interactions with ErbB family. **Bmc Medical Genomics**, v. 2, n. 1, p.1-16, 2009.

SHEPHARD, A.P. et al. Prostate cancer exosomes as modulators of the tumor microenvironment. **Journal Of Cancer Metastasis And Treatment**, v. 3, n. 12, p.288-301, 2017.

SHRESTHA, A. et al. MicroRNA-142 is a multifaceted regulator in organogenesis, homeostasis, and disease. **Developmental Dynamics**, v. 246, n. 4, p.285-290, 2017.

SI, Haiyan et al. Circulating microRNA-92a and microRNA-21 as novel minimally invasive biomarkers for primary breast cancer. **Journal Of Cancer Research And Clinical Oncology**, v. 139, n. 2, p.223-229, 2012.

SKOG J. et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 12, p.1470-1476, 2008.

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 98, n. 19, p.10869-10874, 2001.

SPARANO, Joseph A. et al. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. **New England Journal Of Medicine**, v. 379, n. 2, p.111-121, 2018.

SU, Y.H. ZHOU, Z. YANG, K.P. WANG, X.G. ZHU, Y. Fa, X.E. MIR-142-5p and miR-9 may be involved in squamous lung cancer by regulating cell cycle related genes. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. V. 17, n. 23, p. 3213-3220, 2013.

TALEBI, F. et al. MicroRNA-142 regulates inflammation and T cell differentiation in an animal model of multiple sclerosis. **Journal Of Neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p.1-14, 2017.

TAYLOR D. D.; GERCEL-TAYLOR, C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 110, p. 13-21, 2008.

THERY C.; BOUSSAC, M.; VERON, P.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; RAPOSO, G.; GARIN, J.; AMIGORENA, S. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. **Journal of Immunology**, v. 166, p. 7309-18, 2001.

THERY C.; OSTROWSKI, M.; SEGURA, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, p. 581-93, 2009.

TRAMS E. G.; LAUTER, C. J.; SALEM, N., JR.; HEINE, U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. **Biochim Biophys Acta**, v. 645, p. 63-70, 1981.

TSANG, F. H. et al. MicroRNA-142-3p and microRNA-142-5p are downregulated in hepatocellular carcinoma and exhibit synergistic effects on cell motility. **Frontiers Of Medicine**, v. 9, n. 3, p.331-343, 2015.

UTZON-FRANK, Nicolai et al. Balancing sensitivity and specificity: Sixteen year's of experience from the mammography screening programme in Copenhagen, Denmark. **Cancer Epidemiology**, v. 35, n. 5, p.393-398, 2011.

VAN DER POL E.; BOING, A. N.; HARRISON, P.; STURK, A.; NIEUWLAND, R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. **Pharmacological Reviews**, v. 64, p. 676-705, 2012.

VARGO-GOGOLA, Tracy; ROSEN, Jeffrey M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 9, p.659-672, 2007.

VELLA, L.J. et al. Packaging of prions into exosomes is associated with a novel

pathway of PrP processing. **The Journal Of Pathology**, v. 211, n. 5, p.582-590, abr. 2007.

VOELLENKLE, C. et al. MicroRNA signatures in peripheral blood mononuclear cells of chronic heart failure patients. **Physiological Genomics**, v. 42, n. 3, p.420-426, 2010.

WANG, Bin et al. MiRNA expression in breast cancer varies with lymph node metastasis and other clinicopathologic features. **Iubmb Life**, v. 66, n. 5, p.371-377, 2014.

WANG, Zhao et al. MiR-142-5p Suppresses Tumorigenesis by Targeting PIK3CA in Non-Small Cell Lung Cancer. **Cellular Physiology And Biochemistry**, v. 43, n. 6, p.2505-2515, 2017

XU, Jianzhen; WONG, Chi-wai. Enrichment Analysis of miRNA Targets. **Microna Protocols**, p.91-103, 10 ago. 2012.

XU, Wenda; WANG, Weixing. MicroRNA-142-5p modulates breast cancer cell proliferation and apoptosis by targeting phosphatase and tensin homolog. **Molecular Medicine Reports**, p.7529-7536, 2018.

YÁÑEZ-MÓ, M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal Of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 1, p.1-60, 2015.

YANG, Naibin et al. The role of extracellular vesicles in mediating progression, metastasis and potential treatment of hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 2, p.3683-3695, 2016.

YUANA, Y.; STURK, A.; NIEUWLAND, R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. **Blood Reviews**, v. 27, n. 1, p.31-39, 2013.

ZHANG, X. et al. Combination of hsa-miR-375 and hsa-miR-142-5p as a predictor for recurrence risk in gastric cancer patients following surgical resection. **Annals Of Oncology**, v. 22, n. 10, p.2257-2266, 2011.

8. APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (controle)

Nós, Prof^a. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, Prof^o Dr. Cícero de Andrade Urban, Prof^a Dra. Danielle Malheiros Ferreira, Prof^a Ilce Mara de Syllos Cólus e Me. Patricia Midori Murobushi Ozawa, responsáveis pelo projeto que será executado pelo Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, da Universidade Federal do Paraná, convidamos o(a) senhor(a), a participar de um estudo intitulado “*Identificação de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico por métodos não invasivos em portadores de carcinomas primários de mama e de próstata*”, na qualidade de indivíduo controle.

Biomarcadores são moléculas presentes no organismo de indivíduos com uma condição específica (neste caso, câncer de mama ou de próstata) e que permitem realizar a sua distinção de indivíduos livres dessa condição. A identificação destas moléculas permite o desenvolvimento de novas formas de diagnóstico não invasivo, ou seja, em que não é necessária uma biópsia do tumor, o que pode favorecer a detecção precoce da doença. Além do diagnóstico precoce, a identificação destes biomarcadores pode também, no futuro, auxiliar os médicos responsáveis a categorizar melhor o tipo de câncer de cada paciente e desta forma decidir com maior precisão o tipo de tratamento.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é identificar biomarcadores presentes no soro de pacientes com câncer de mama e próstata, que sejam capazes de auxiliar no diagnóstico, classificação, tratamento e prognóstico. É importante ressaltar que este grupo realiza pesquisa básica, sendo que os dados obtidos a partir deste estudo serão dados preliminares e que não serão imediatamente implementados na clínica. Para que esses biomarcadores sejam implementados há a necessidade de estudos adicionais e comprovação de sua eficácia pela comunidade científica. Portanto, não há benefício imediato aos pacientes e tampouco risco de identificação genética de qualquer natureza.

Caso você decida participar da pesquisa, é necessário ter mais de 18 anos, não possuir histórico pessoal de câncer e nem suspeita familiar de câncer hereditário e será necessário permitir a coleta de alíquota de sangue (1 tubo de soro de 8ml), bem como conceder informações a respeito da sua idade, e condições de saúde (se possui outro algum tipo de doença como diabetes e doenças autoimunes) e se está fazendo uso de medicamento de uso contínuo.

Essas amostras serão obtidas momentos após a abordagem médica durante a acompanhamento de consulta a um paciente ou mediante voluntariado, o que não levará mais do que 10 minutos. É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado ao local de onde será retirado o sangue. É possível que surja uma mancha arroxeadada no local da introdução da agulha, mas ela desaparecerá ao longo dos dias, mas se o(a) senhor(a) desejar pode ser aplicada uma pomada no local para facilitar o desaparecimento da mancha. O material obtido, sangue periférico (obtido por punção venosa), será utilizado unicamente para essa pesquisa e será consumido inteiramente durante o estudo.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal _____
 Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____
 Orientador _____

Os benefícios esperados com essa pesquisa incluem o desenvolvimento de métodos não invasivos (sem necessidade de biópsia) de identificação precoce de indivíduos com câncer de mama e próstata, ou que classifiquem melhor os pacientes dentro de subgrupos, contribuindo para o direcionamento do tratamento. Esclarecemos que embora seja uma pesquisa genética, as informações que serão obtidas não se constituem em parâmetros hereditários e não são transmitidos para futuras gerações, portanto não há necessidade de aconselhamento genético nem de outro tipo de preocupação ou cuidado.

Os pesquisadores responsáveis por este estudo poderão ser localizados no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, sala 25, da Universidade Federal do Paraná, Campus Politécnico, Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos, 210, fone (41) 3361-1728, no horário das 9h às 17h (ou a qualquer momento no e-mail eribeiro@ufpr.br) para esclarecer eventuais dúvidas que o (a) senhor(a) possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

A sua participação neste estudo é voluntária e se o(a) senhor(a) não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas, como o pesquisador responsável, o médico e a aluna de pós-graduação envolvida na pesquisa. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e mantida sua confidencialidade**. Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

As despesas necessárias para a realização da pesquisa, como o transporte do material biológico do hospital até a universidade e todos os reagentes utilizados durante a pesquisa, não são de sua responsabilidade e o(a) senhor(a) não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação.

Se tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259.

Eu, _____ li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Curitiba, ____ de _____ de ____.

[Assinatura do Participante de Pesquisa ou Responsável Legal]

[Assinatura do Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE]

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (paciente)

Nós, Prof^a. Dra. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, Prof^o Dr. Cícero de Andrade Urban, Prof^a Dra. Danielle Malheiros Ferreira, Prof^a Ilce Mara de Syllos Cólus e Me. Patricia Midori Murobushi Ozawa, responsáveis pelo projeto que será executado pelo Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, da Universidade Federal do Paraná, convidamos a senhora, paciente com histórico pessoal de câncer de mama a participar de um estudo intitulado “*Identificação de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico por métodos não invasivos em portadores de carcinomas primários de mama e de próstata*”.

Biomarcadores são moléculas presentes no organismo de indivíduos com uma condição específica (neste caso, câncer de mama) e que permitem realizar a sua distinção de indivíduos livres dessa condição. A identificação destas moléculas permite o desenvolvimento de novas formas de diagnóstico não invasivo, ou seja, em que não é necessária uma biópsia do tumor, o que pode favorecer a detecção precoce da doença. Além do diagnóstico precoce, a identificação destes biomarcadores pode também, no futuro, auxiliar os médicos responsáveis a categorizar melhor o tipo de câncer de cada paciente e desta forma decidir com maior precisão o tipo de tratamento.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é identificar biomarcadores presentes no soro de pacientes com câncer de mama e próstata, que sejam capazes de auxiliar no diagnóstico, classificação, tratamento e prognóstico. É importante ressaltar que este grupo realiza pesquisa básica, sendo que os dados obtidos a partir deste estudo serão dados preliminares e que não serão imediatamente implementados na clínica. Para que esses biomarcadores sejam implementados há a necessidade de estudos adicionais e comprovação de sua eficácia pela comunidade científica. Portanto, não há benefício imediato aos pacientes e tampouco risco de identificação genética de qualquer natureza.

Caso você decida participar da pesquisa, é necessário ter mais de 18 anos e será necessário permitir a coleta de alíquotas de sangue (1 tubo de soro de 8ml), bem como conceder permissão para consulta de seu prontuário e resultados de exames. As informações que serão consultadas serão: idade, grau do tumor, tamanho do tumor, presença ou ausência de metástases em linfonodos ou à distância.

Essas amostras serão obtidas momentos antes da cirurgia para retirada do tumor e, para alguns pacientes que serão selecionados após as primeiras análises, após alguma consulta médica de retorno, o que não levará mais do que 10 minutos. É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado ao local de onde será retirado o sangue. É possível que surja uma mancha arroxada no local da introdução da agulha, mas ela desaparecerá ao longo dos dias, mas se a senhora desejar pode ser aplicada uma pomada no local para facilitar o desaparecimento da mancha. O material obtido, sangue periférico (obtido por punção venosa), será utilizado unicamente para essa pesquisa e será consumido inteiramente durante o estudo.

Os benefícios esperados com essa pesquisa incluem o desenvolvimento de métodos não invasivos (sem necessidade de biópsia) de identificação precoce de indivíduos com câncer de mama e próstata, ou que classifiquem melhor os pacientes dentro de subgrupos, contribuindo para o direcionamento do tratamento. Esclarecemos que embora seja uma pesquisa genética, as informações que serão obtidas não se constituem em parâmetros hereditários e não são transmitidos para futuras gerações, portanto não há necessidade de aconselhamento genético nem de outro tipo de preocupação ou cuidado.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal _____
 Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____
 Orientador _____

Os pesquisadores responsáveis por este estudo poderão ser localizados no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, sala 25, da Universidade Federal do Paraná, Campus Politécnico, Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos, 210, fone (41) 3361-1728, no horário das 9h às 17h (ou a qualquer momento no e-mail eribeiro@ufpr.br) para esclarecer eventuais dúvidas que o (a) senhor(a) possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

A sua participação neste estudo é voluntária e se a senhora não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas, como o pesquisador responsável, o médico e a aluna de pós-graduação envolvida na pesquisa. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e mantida sua confidencialidade**. Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

As despesas necessárias para a realização da pesquisa, como o transporte do material biológico do hospital até a universidade e todos os reagentes utilizados durante a pesquisa, não são de sua responsabilidade e a senhora não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação.

Se tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259.

Eu, _____ li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Curitiba, ____ de _____ de ____.

[Assinatura do Participante de Pesquisa ou Responsável Legal]

[Assinatura do Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE]

9. ANEXO

Parecer do Comitê de Ética

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de biomarcadores por métodos não invasivos em portadores de câncer esporádico.

Pesquisador: Enilze Ribeiro

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 67029617.4.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de Pós-Graduação em Genética

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.033.689

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa proveniente do Programa de Pós-Graduação em Genética, sob responsabilidade da Professora Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, Cícero de Andrade Urban, Danielle Malheiros Ferreira, Ilce Mara de Syllós Cólus e Patricia Midori Murobushi Ozawa. O estudo será realizado utilizando amostras de sangue de pacientes com histórico pessoal de câncer de mama e próstata esporádicos, provenientes do Hospital Nossa Senhora das Graças, na cidade de Curitiba. Devido ao alto grau de complexidade dos cânceres, é necessário que haja o desenvolvimento de métodos que permitam estratificar os pacientes para que seja possível um tratamento mais direcionado e efetivo, aumentando as chances de sobrevivência. Dessa forma, a pesquisa envolvendo vesículas extracelulares circulantes envolvidas no processo de comunicação celular tem o potencial de revelar novos marcadores para subtipos de câncer de mama e próstata, uma vez que o perfil de DNAs, diferentes RNAs e proteínas destas vesículas pode refletir o perfil da célula tumoral. As amostras de sangue para obtenção de soro serão coletadas antes e após a cirurgia para retirada do tumor, e serão processadas para extração das vesículas extracelulares e de seu conteúdo no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética da Universidade Federal do Paraná

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br